

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Complexos de Pd(II) e Pt(II) contendo tiossemicarbazonas derivadas do tiofeno: Síntese, caracterização, investigação da citotoxicidade e modo de ação”

Gabriela Porto de Oliveira\*

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTORA EM  
CIÊNCIAS, área de concentração:  
QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador(a): Fillipe Vieira Rocha

\* bolsista (CNPq)

São Carlos – SP

2022



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Gabriela Porto de Oliveira, realizada em 16/03/2022.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Douglas Hideki Nakahata (UFG)

Profa. Dra. Carolina Gonçalves Oliveira (UFU)

Profa. Dra. Maribel Coromoto Navarro Acosta (UFJF)

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao prof. Fillipe Vieira Rocha pela compreensão e apoio na troca de orientação, pelas oportunidades, pela confiança, pelos ensinamentos e amizade. Por estar disposto a embarcar em novos desafios químicos sempre e por acreditar em meu potencial para juntos resolvermos. Por prezar não só pelo andamento do trabalho, mas também pelo bem estar do aluno.

Agradeço ao meu grupo de laboratório CCQM (Mauro, Josias, George, Dário, Vinicius, Ludimila, Vitão, Amos, Fábio-Lol, Débora-Waze, Lukita, Herisson-Belém) que mesmo antes de pertencer ao mesmo, vocês já faziam com que eu me sentisse pertencida. Obrigada pelas trocas de conhecimentos, contribuições para o meu crescimento profissional e pessoal, pelos momentos de descontração, risadas, jogatinas e zueiras que fizeram com que a caminhada se tornasse mais leve. Sou sinceramente grata pela amizade e por ter conhecido cada um de vocês (da UFSCAR pra vida!). Obrigada ao Mauro pela paciência, pelos ensinamentos no biológico e pela colaboração nos ensaios frente as enzimas. Em especial a Ludimila, por estar presente nos momentos bons e difíceis da pós graduação, por ter me dado forças pra não desistir e pela construção de uma amizade linda que ultrapassa distâncias.

Agradeço ao grupo de laboratório LERCI (UFSCAR), principalmente as meninas Tamires, Celis, Leticia e Jocely pelos ensinamentos no biológico e pela convivência. Em especial a Analu Rocha pela enorme paciência, por estar sempre disposta a me ajudar na realização dos experimentos, pela colaboração nos ensaios de Clonogenese, Ciclo Celular e Apoptose, pelos desabafos (por que o estudante não tem um único dia de paz!) e pelas risadas. Agradeço ao professor Dr. Alzir por disponibilizar o espaço para a realização dos ensaios de citotoxicidade e ao Dr. João Honorato e prof. Dr. Javier Ellena (IFSC-USP) pela colaboração nas medidas de Difração de raios X em monocristal.

Agradeço ao Dr. Renan Lira pelos cálculos de Docking com o DNA, os quais foram extremamente valiosos para a discussão dos resultados. Agradeço também ao Ms. Renan Zanetti (UNESP) pela disponibilidade e realização dos ensaios de Dicroísmo Circular e Ensaio com Hoeschst. Agradeço também ao prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto pela parceria com o nosso grupo de pesquisa, a qual permitiu a realização dos ensaios.

Agradeço ao apoio do meu namorado Wytan, por acreditar verdadeiramente no meu potencial, por me motivar a persistir nos meus sonhos independentes dos obstáculos, por me compreender, me acolher e por não medir esforços para me ajudar e pela parceria ao longo desses 11 anos ao meu lado. Obrigada, por ter feito com que esse ciclo fosse mais leve com a sua presença e do nosso dog Minduim, que veio pra alegrar ainda mais nossas vidas e me tornar uma pessoa melhor. Estendo os meus agradecimentos a sua família, que já se tornou a minha, por me acolherem da melhor forma possível, por se preocuparem com o meu bem estar, por me motivarem e por me ajudarem tanto financeiramente quanto psicologicamente, amo vocês e serei sempre extremamente grata por todo apoio!

Obrigada a minha família por compreender a minha ausência durante esse tempo, principalmente nos momentos difíceis em que não pude estar presente. Agradeço de verdade pelo apoio, amo vocês.

Agradeço por ter conhecido pessoas maravilhosas em São Carlos e pelos momentos de descontração e jogatina (Victor-Barata, Karina-Rodo, Markito, Neto, Hugo, Danilo-japa, Andressa, Manu, Lucas).

Ao fechar esse ciclo, eu não poderia deixar de agradecer a minha turma de licenciatura da FURG pela amizade até hoje. Ao pessoal do bacharelado que tive a honra de conhecer e compartilhar momentos. Agradeço também aos professores por contribuírem de forma significativa com a minha formação.

Agradeço ao meu amigo e eterno IC Douglas, o qual participou e contribuiu para a minha formação. Obrigada pelas trocas de conhecimento, ajuda no inglês e pela amizade, admiro muito você!

Agradeço a minha amiga Alessandra, que mesmo longe me apoiou e esteve disposta a me ajudar e me escutar em situações difíceis. Obrigada por fazer com que a nossa amizade permaneça firme e forte e permitir que mesmo com a distância eu ainda participe da sua vida!

Ao corpo técnico e administrativo do Programa de Pós graduação em Química da UFSCar pelo auxílio em todas as etapas do doutorado. Obrigada aos professores de química por todos ensinamentos compartilhados, sou extremamente grata.

Agradeço ao apoio da CNPQ pela bolsa concedida, a qual possibilitou a realização desse trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer

**SKOV-3** – Câncer de ovário

**PC3** – Câncer de próstata humano

**CCR** – Câncer colorretal

**RR** – Ribonucleotídeo redutase

**3-AP** – Triapina

**OVCAR-3** – Câncer de ovário

**K<sub>b</sub>** – Constante intrínseca de ligação

**HepG-2** – Câncer de fígado humano

**Hela** – Câncer cervical

**HL-60** – Leucemia Mielóide aguda

**CT-DNA** – Ácido desoxirribonucléico de timo de bezerro (DeoxyriboNucleic Acid sodium salt from Calf Thymus)

**MCF-7** – Linhagem tumoral de mama

**ATP** – Adenosina trifosfato

**CD** – Dicroísmo Circular

**CCD** – Cromatografia em camada delgada

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**ACN** – Acetonitrila

**ICs** – Iodeto de céσιο

**pBr322** – DNA plasmidial

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**RMSD** – desvios médios quadráticos

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**TBE** – Tampão Tris-Borato-EDTA

**RNASE** – Ribonuclease

**PI** – Iodeto de propídeo

**CDCl<sub>3</sub>** – Clorofórmio deuterado

**LMCT** – Transferência de carga Ligante – metal

**PDB** – *Protein Data Bank*

**DC23** – Pentose do nucleotídeo da citosina 23  
**DG4** – Pentose do nucleotídeo guanina 4  
**DT19** – Subunidade pirimidina da base Timina 19  
**DA17, DA18, DA5, DA6** – Bases adeninas  
**TNBC** – Câncer de mama triplo negativo  
**HSA** - Human Serum Albumin (Albumina de Soro Humana)  
**TSC** - Tiossemicarbazonas  
**MDA-MB-231**- Adenocarcinoma de mama (triplo negativo)  
**A549**- Câncer de pulmão  
**DU-145** – Câncer de próstata  
**A2780 Cis** – Câncer de ovário  
**MRC-5** – Células não tumorais de pulmão humano  
**IC<sub>50</sub>** - Concentração que inibe 50% do crescimento celular  
**IS** – Índice de seletividade  
**PPh<sub>3</sub>** - Trifenilfosfina  
**FBS** - *Fetal Bovine Serum* (Soro fetal bovino)  
**PBS** - Tampão salino de fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)  
**DMEM**- Meio de cultura Dulbecco Modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)  
**RPMI**- Meio de Cultura *Roswell Park Memorial Institute*  
**MTT**- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
**IV**- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho  
**UV-vis**- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível  
**RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}** - Ressonância Magnética Nuclear de fósforo desacoplado do <sup>1</sup>H  
**COSY** – Correlation spectroscopy (Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)  
**HMBC** – Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Mapa de contorno da correlação <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C)  
**HSQC** – Heteronuclear Single Quantum Coherence (Mapa de contorno da correlação <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C)  
**DEPT – 135** – Distortionless enhancement with polarization transfer  
**ESI/MS**- Espectrometria de Massas  
**DRX** – Difração de raios X em monocristal

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação do processo de metástase. <sup>4</sup> .....	1
FIGURA 1.2 - Incidência de câncer no Brasil para o triênio 2020-2022. <sup>6</sup> .....	2
FIGURA 1.3 - Mecanismo de ação proposto para o fármaco Cisplatina. <sup>8</sup> .....	4
FIGURA 1.4 - Compostos a base de platina usados no tratamento de câncer. <sup>9</sup> ...	6
FIGURA 1.5 - Mecanismo de obtenção das tiossemicarbazonas. <sup>24</sup> .....	8
FIGURA 1.6 - Estrutura dos compostos 3 - AP e Triapina 3 - AP .....	9
FIGURA 1.7 - Compostos derivados de tiossemicarbazonas com atividade anticâncer .....	9
FIGURA 1.8 - Compostos de tiossemicarbazonas desenvolvidos por Zhangxu He et al. <sup>32</sup> .....	10
FIGURA 1.9 - Compostos derivados do heterociclo tiofeno com potencial atividade citotóxica. <sup>38</sup> .....	12
FIGURA 1.10 - Representação estrutural dos fármacos Raltitrexed e Triapina. <sup>30</sup> .....	13
FIGURA 1.11 - Compostos derivados da hibridização molecular entre tiossemicarbazonas e o heterociclo tiofeno como antineoplásicos. <sup>30,37,39,40</sup> .....	14
FIGURA 1.12 - Mecanismo associativo de substituição de ligantes em complexos d <sup>8</sup> .....	15
FIGURA 1.13 - Complexos antineoplásicos de paládio contendo trifenilfosfina. <sup>48,49,50,51,52,53</sup> .....	17
FIGURA 1.14 - Complexos de paládio desenvolvidos por Haribabu et al em 2018. <sup>48</sup> .....	18
FIGURA 1.15 - Complexos de paládio com trifenilfosfina por Haribabu em 2020. <sup>51</sup> .....	19
FIGURA 1.16 - Complexos de Pd(II) e Pt(II) constituídos por tiossemicarbazonas e tiofeno. <sup>54</sup> .....	20
FIGURA 1.17 - Estrutura dos complexos sintetizados por Mbugua et al. em 2020. <sup>55</sup> .....	21
FIGURA 1.18 - Modos de coordenação possíveis para compostos derivados de tiossemicarbazonas e tiofeno. <sup>40,56,57,58,59,60</sup> .....	22
FIGURA 1.19 - Complexos de paládio sintetizados por Nyawade et al. em 2021. <sup>40</sup> .....	23
FIGURA 1.20 - Ciclometalação de compostos de paládio observada por Lobana et al. em 2012. <sup>60</sup> .....	25
FIGURA 1.21 - Interações possíveis entre os complexos e o DNA. Fonte: adaptada da literatura. <sup>62</sup> .....	26
FIGURA 1.22 - Diferenças na atividade das enzimas. <sup>68</sup> .....	27



FIGURA 1.23 - Exemplos de alguns venenos e inibidores catalíticos das enzimas topoisomerases. <sup>71,72,73,74,33</sup> .....	29
FIGURA 1.24 - Estrutura genérica dos compostos propostos. Fonte: autor. ....	30
FIGURA 3.1 - Reação de condensação para obtenção dos ligantes. ....	34
FIGURA 3.2 - Reação para obtenção dos complexos [MCl(L)PPh <sub>3</sub> ]. ....	35
FIGURA 3.3 - Reação para obtenção dos complexos [M(X)(L)PPh <sub>3</sub> ] <sup>+1</sup> . ....	36
FIGURA 3.4 - Sobreposição entre as estruturas minimizadas (átomos de C em bege) e experimental (átomos de C em cinza), dos complexos PdCH <sub>3</sub> e PdBr. Os valores de RMSD = 0,2219 Å e 0,4424 Å aprovam o protocolo de modelagem molecular implementado. ....	44
FIGURA 4.1 - Proposta de mecanismo para obtenção dos complexos. ....	50
FIGURA 4.2 - Sobreposição dos espectros de FTIR para o ligante TET (preto) e os complexos PdT (azul) e PtT (rosa): (a) espectro geral e ampliação da região NH, (b) ampliação da região dos estiramentos C=N e C=S e (c) ampliação da região das bandas Pd-N e Pd-S. ....	53
FIGURA 4.3 - Sobreposição dos espectros de U.V-Vis dos ligantes (preto) e seus complexos de Pd(II) (roxo) e Pt(II) (rosa) obtidos em DMSO na concentração de 1x10 <sup>-5</sup> M <sup>-1</sup> . ....	57
FIGURA 4.4 - Esquema de numeração para os compostos propostos. ....	59
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o ligante TET em CDCl <sub>3</sub> . ....	61
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o complexo PdT em CDCl <sub>3</sub> . ....	62
FIGURA 4.7 - Comparação entre os espectros de RMN <sup>1</sup> H do ligante TET e do complexo PdT em CDCl <sub>3</sub> . ....	63
FIGURA 4.8 - Espectro de RMN de <sup>31</sup> P do complexo PdT em CDCl <sub>3</sub> . ....	64
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN de <sup>31</sup> P do complexo PtT em CDCl <sub>3</sub> . ....	65
FIGURA 4.10 - Sobreposição dos espectros de RMN <sup>13</sup> C do ligante TET (preto) e do complexo PdT (azul) em CDCl <sub>3</sub> . ....	66
FIGURA 4.11 - Sobreposição dos espectros de RMN DEPT-135 do ligante TET (preto) e do complexo PdT (azul) em CDCl <sub>3</sub> . ....	67
FIGURA 4.12 - Ampliação do mapa de contorno da correlação <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H HSQC do complexo PdT em CDCl <sub>3</sub> . ....	68
FIGURA 4.13 - Estruturas cristalográficas obtidas para o ligante e para os complexos. Os átomos estão representados no modelo ORTEP (elipsóides 30%). ....	69
FIGURA 4.14 - Estruturas cristalográficas provenientes das reações com subprodutos. Os átomos estão representados no modelo ORTEP (elipsóides 30%). ....	70
FIGURA 4.15 - Unidade assimétrica do composto CLET. As elipsóides térmicas são apresentadas com probabilidade de 30 %. ....	71

FIGURA 4.16 - Representação das interações intramoleculares para o composto CLET ao longo do eixo cristalográfico <i>a</i> .....	72
FIGURA 4.17 - Representação de interações intermoleculares para o composto CLET vistas ao longo do eixo cristalográfico <i>a</i> . Código de simetria: (i) 1-x, 0.5+y, 1.5-z.....	72
FIGURA 4.18 - Representação da unidade assimétrica para o composto PdBr. As elipsóides térmicas são apresentadas com probabilidade de 30 %.....	74
FIGURA 4.19 - Plano traçado nos átomos não-hidrogenóides do complexo PdBr.....	76
FIGURA 4.20 - Representação das interações intramoleculares presentes no complexo PdBr ao longo do eixo cristalográfico <i>b</i> .....	77
FIGURA 4.21 - Interações intermoleculares presentes no complexo PdBr ao longo do eixo cristalográfico <i>ab</i> . Código de simetria: (i) 0.5-x,-1.5+y,-1.5-z (ii) x,-1+y,z.....	78
FIGURA 4.22 - Representação da rede tridimensional a partir de interações intermoleculares ao longo do eixo cristalográfico <i>ab</i> para o complexo PdBr. Código de simetria: (i) 0.5-x,-1.5+y,-1.5-z (ii) x,-1+y,z.....	79
FIGURA 4.23 - Espectro de massas para o composto PdBr em m/z.....	80
FIGURA 4.24 - Curva padrão de Lipofilicidade do composto PdT pela técnica de Ultravioleta-visível obtida a partir de oito adições sucessivas da solução do complexo $2,12 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ em n-octanol em uma cubeta contendo 2500 $\mu\text{L}$ de n-octanol .....	81
FIGURA 4.25 - Comparação entre os coeficientes de partição dos complexos obtidos e dos fármacos padrões amplamente conhecidos.....	82
FIGURA 4.26 - Espectros de RMN de $^{31}\text{P}$ do complexo PdBr em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48h.....	84
FIGURA 4.27 - Espectros de RMN de $^{31}\text{P}$ do complexo PdBr em DMSO-D2O/DMEM nos tempos de 0,24 e 48h.....	84
FIGURA 4.28 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ do complexo PdBr em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48h.....	85
FIGURA 4.29 - Estabilidade das soluções dos ligantes $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48h.....	86
FIGURA 4.30 - Estabilidade das soluções dos complexos $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ em DMSO em 0, 24, 48h e 72h. ....	87
FIGURA 4.31 - Espectros do complexo PtBr na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ em (a) DMSO e (b) $\text{CHCl}_3$ . ....	87
FIGURA 4.32 - Estudo de estabilidade dos complexos de paládio na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ em acetona em 0, 24 e 48h. ....	88

FIGURA 4.33 - Estudo de estabilidade dos complexos de platina na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ em acetona em 0, 24 e 48h. ....	89
FIGURA 4.34 - Estudo de estabilidade dos complexos na concentração $1 \times 10^{-5} \text{M}$ em DMSO sem luz em 0, 24 e 48h. ....	90
FIGURA 4.35 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}$ em $\text{CDCl}_3$ do complexo PdT(DMSO). .	92
FIGURA 4.36 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}$ em $\text{CDCl}_3$ do complexo PdT.....	92
FIGURA 4.37 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}$ em $\text{CDCl}_3$ do complexo PtT(DMSO). .	93
FIGURA 4.38 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}$ em $\text{CDCl}_3$ do complexo PtT.....	94
FIGURA 4.39 - Interação do complexo PdCH <sub>3</sub> com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração 40 $\mu\text{M}$ do complexo PdCH <sub>3</sub> se manteve fixa e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,9 a 49,0 $\mu\text{M}$ ). ....	96
FIGURA 4.40 - Interação do complexo PtBr com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração 40 $\mu\text{M}$ do complexo PtBr se manteve fixa e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,9 a 49 $\mu\text{M}$ ). ....	97
FIGURA 4.41 - Interação dos complexos com ct-DNA por Eletroforese em gel. (a) C+ (Linha 1): água, cisplatina e DNA, C- (Linha 2): água e DNA. Linha 3: PdT (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 4: PdT (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 5: PdT (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 6: PdT (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 7: PdCl (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 8: PdCl (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 9: PdCl (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 10: PdCl (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 11: PdBr (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 12: PdBr (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 13: PdBr (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 14: PdBr (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 15: PdCH <sub>3</sub> (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 16: PdCH <sub>3</sub> (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 17: PdCH <sub>3</sub> (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 18: PdCH <sub>3</sub> (0,1 $\mu\text{M}$ ). (b) C+ (Linha 1): água, cisplatina e DNA, C- (Linha 2): água e DNA. Linha 3: PtBr (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 4: PtBr (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 5: PtBr (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 6: PtBr (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 7: PtT (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 8: PtT (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 9: PtT (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 10: PtT (0,1 $\mu\text{M}$ ). ....	99
FIGURA 4.42 - Espectros de CD obtidos a partir de adições de concentrações crescentes dos complexos PdT em DMSO nas concentrações de 0 a $2 \times 10^{-5} \text{M}^{-1}$ (razão complexo/DNA de 0 a 0,4) na solução do DNA em tampão Tris-HCl de concentração fixa de $5 \times 10^{-5} \text{M}^{-1}$ . ....	102
FIGURA 4.43 - Espectros de CD obtidos a partir de adições de concentrações crescentes dos complexos PdCl em DMSO nas concentrações de 0 a $2 \times 10^{-5} \text{M}^{-1}$ (razão complexo/DNA de 0 a 0,4) na solução do DNA em tampão Tris-HCl de concentração fixa de $5 \times 10^{-5} \text{M}^{-1}$ . ....	103
FIGURA 4.44 - Efeito do complexo PdT na viscosidade relativa do DNA comparado com o padrão Tiazol e o DNA livre. Espectro obtido a partir de diferentes relações DNA em tampão Tris-HCl/complexo em DMSO (10%). .	104

FIGURA 4.45 - Espectro de fluorescência do aduto Hoescht-DNA após a adição de concentrações crescentes do complexo PdT. A concentração de DNA foi mantida fixa em $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ e do Hoechst em $6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ e a concentração dos complexos variou de 0 até $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .....	106
FIGURA 4.46 - Espectro de fluorescência do aduto Hoescht-DNA após a adição de concentrações crescentes do complexo PdCl. A concentração de DNA foi mantida fixa em $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ e do Hoechst em $6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ e a concentração dos complexos variou de 0 até $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .....	106
FIGURA 4.47 - Simulação de interação entre os compostos de Pd(II) e o DNA (PDB ID 1NBA) a partir do software autodock4, modo semiflexível. Na figura, os complexos estão desenhados como bolas e bastões, o DNA como cartoon e as interações estão na forma de linhas tracejadas em cor preta. Os hidrogênios não polares foram omitidos para melhor visualização.....	108
FIGURA 4.48 - Simulação de interação entre os compostos de Pt(II) e o DNA (PDB ID 1NBA) a partir do software autodock4, modo semiflexível. Na figura, os complexos estão desenhados como bolas e bastões, o DNA como cartoon e as interações estão na forma de linhas tracejadas em cor preta. Os hidrogênios não polares foram omitidos para melhor visualização.....	109
FIGURA 4.49 - Avaliação do efeito dos complexos de paládio frente a enzima topoisomerase II $\alpha$ por eletroforese em gel. C+ (Linha 1): mix, água, DNA e topo II $\alpha$ , C- (Linha 2): mix, água e DNA, Linha 3: PdCH <sub>3</sub> (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 4: PdCH <sub>3</sub> (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 5: PdCH <sub>3</sub> (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 6: PdCH <sub>3</sub> (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 7: PdCl (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 8: PdCl (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 9: PdCl (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 10: PdCl (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 11: PdBr (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 12: PdBr (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 13: PdBr (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 14: PdBr (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 15: PdT (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 16: PdT (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 17: PdT (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 18: PdT (0,1 $\mu\text{M}$ ). .....	112
FIGURA 4.50 - Efeito dos complexos de platina frente a enzima topoisomerase II $\alpha$ por eletroforese em gel. C- (Linha 1): mix, água e DNA, C+ (Linha 2): mix, água, DNA e topo II $\alpha$ . Linha 3: PtT (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 4: PtT (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 5: PtT (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 6: PtT (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 7: PtBr (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 8: PtBr (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 9: PtBr (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 10: PtBr (0,1 $\mu\text{M}$ ). .....	113
FIGURA 4.51 - Interação entre os complexos PdT e PdBr e seus análogos de platina e a Topoisomerase II $\beta$ por eletroforese em gel. C-(Linha 1): mix, água e DNA, C+(Linha 2): mix, água, DNA e topo II $\beta$ . Linha 3: PdT (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 4: PdT (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 5: PdT (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 6: PdT (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 7: PdBr (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 8: PdBr (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 9: PdBr (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 10: PdBr (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 11: PtT (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 12: PtT (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 13: PtT (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 14: PtT (0,1 $\mu\text{M}$ ). Linha 15: PtBr (100 $\mu\text{M}$ ), Linha 16: (10 $\mu\text{M}$ ), Linha 17: PtBr (1 $\mu\text{M}$ ), Linha 18: PtBr (0,1 $\mu\text{M}$ ). .....	114

FIGURA 4.52 - Efeito dos complexos de paládio na inibição da Topoisomerase I $\beta$  por eletroforese em gel. C- (Linha 1): mix, água e DNA, C+(Linha 2): mix, água, DNA e topo I $\beta$ . Linha 3: PdCl (100  $\mu$ M), Linha 4: PdCl (10  $\mu$ M), Linha 5: PdCl (1  $\mu$ M), Linha 6 (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PdBr (100  $\mu$ M), Linha 8: PdBr (10  $\mu$ M), Linha 9: PdBr (1  $\mu$ M), Linha 10: PdBr (0,1  $\mu$ M). Linha 11: PdT (100  $\mu$ M), Linha 12: PdT (10  $\mu$ M), Linha 13: PdT (1  $\mu$ M), Linha 14: PdT (0,1  $\mu$ M). Linha 15: PdCH<sub>3</sub> (100  $\mu$ M), Linha 16: PdCH<sub>3</sub> (10  $\mu$ M), Linha 17: PdCH<sub>3</sub> (1  $\mu$ M), Linha 18: PdCH<sub>3</sub> (0,1  $\mu$ M). ..... 115

FIGURA 4.53 - Interação entre os complexos de platina e a enzima Topoisomerase I $\beta$  por eletroforese em gel. C- (Linha 1): mix, água e DNA, C+ (Linha 2): mix, água, DNA e topo I $\beta$ . Linha 3: PtT (100  $\mu$ M), Linha 4: PtT (10  $\mu$ M), Linha 5: PtT (1  $\mu$ M), Linha 6: PtT (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PtBr (100  $\mu$ M), Linha 8: PtBr (10  $\mu$ M), Linha 9: PtBr (1  $\mu$ M), Linha 10: PtBr (0,1  $\mu$ M)..... 116

FIGURA 4.54 - Efeito do complexo PdT na migração celular da linhagem A549 nas concentrações de 0,247, 0,495 e 0,99  $\mu$ M e nos tempos de 0, 24 e 48h..... 120

FIGURA 4.55 - Efeito do complexo PdT em diferentes concentrações na migração celular da linhagem A549. Dados da área de fechamento da risca foram obtidos a partir das imagens em triplicata no *software ImageJ*. Níveis de significância \*\*p=0.0095, \*\*\*p=0.0001 e \*\*\*\*p<0.0001 utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em  $\pm$  DS (n=3). ..... 121

FIGURA 4.56 - Ensaio de morfologia celular para o complexo PdT na linhagem celular tumoral A549 nas concentrações entre 0,495 a 7,92  $\mu$ M e imagens capturadas nos tempos de 0, 24 e 48h. .... 123

FIGURA 4.57 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na migração celular da linhagem A2780 Cis nas concentrações de 0,01, 0,03 e 0,07  $\mu$ M nos tempos de 0, 24 e 48h. .... 124

FIGURA 4.58 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> em diferentes concentrações na migração celular da linhagem A2780 Cis. Dados da área de fechamento da risca foram obtidos a partir das imagens em triplicata no *software ImageJ*. Níveis de significância \*\*\*p=0.0001 e \*\*\*\*p<0.0001 utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em  $\pm$  DS (n=3). ..... 125

FIGURA 4.59 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na morfologia da linhagem celular A2780 Cis nas concentrações entre 0,035 a 0,56  $\mu$ M e imagens capturadas nos tempos de 0, 24 e 48h. .... 127

FIGURA 4.60 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na morfologia da linhagem celular A2780 Cis nas concentrações 0,14  $\mu$ M e 0,28  $\mu$ M nos tempos de 24 e 48h. ... 128

FIGURA 4.61 - Efeito da influência do complexo PdCH<sub>3</sub> em diferentes concentrações (0,035 a 0,56  $\mu$ M) na formação de colônias de células da linhagem A2780 Cis. Número de colônias em cada concentração foi obtido a

partir das imagens em triplicata no *software ImageJ*. Nível de significância  
 \*\*\*\* $p < 0.0001$  utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em  $\pm$  DS (n=3).  
 ..... 129

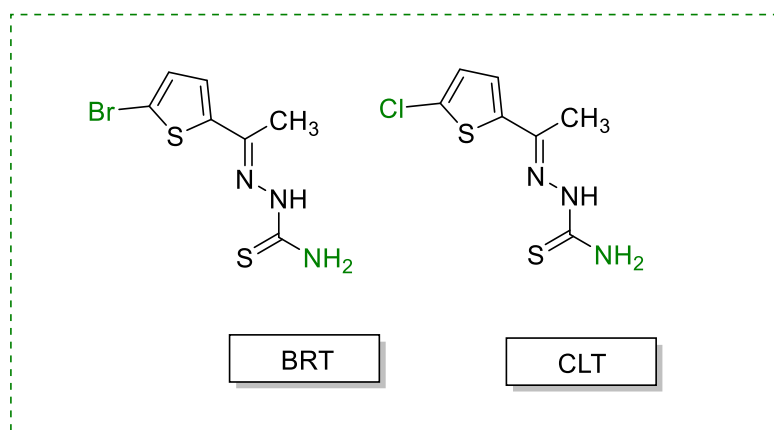
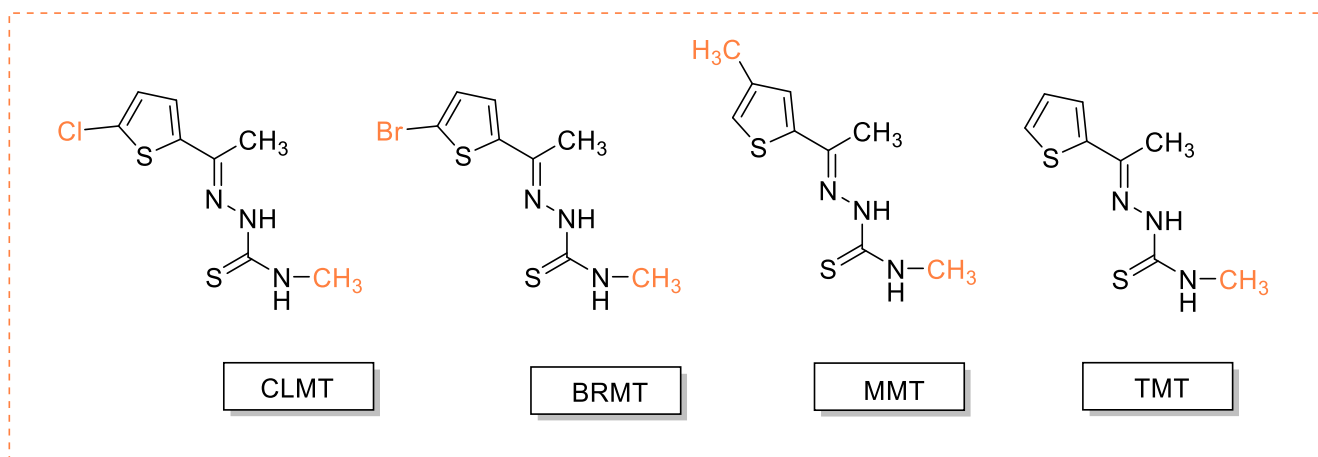
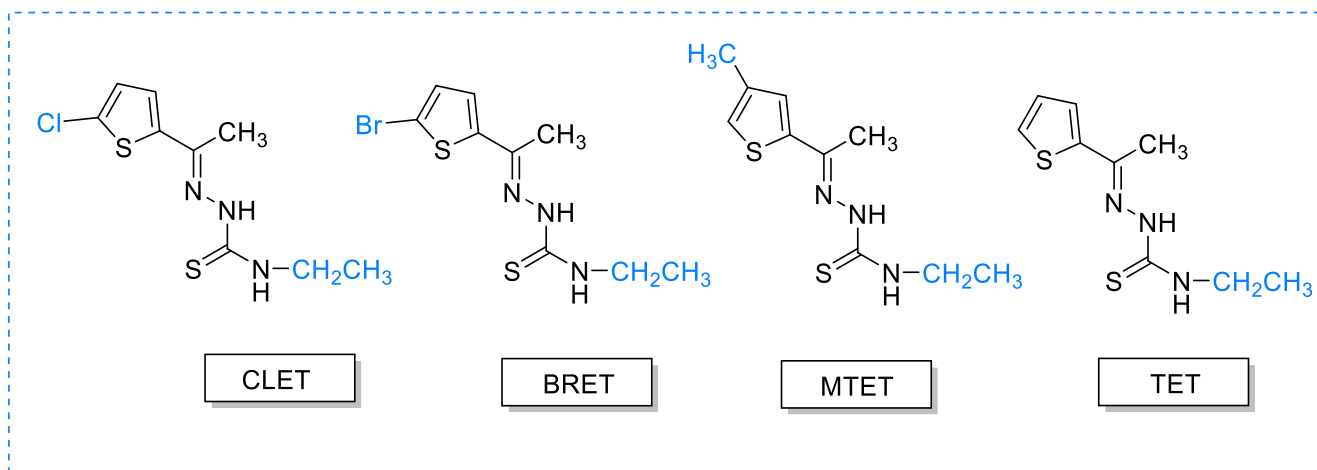
FIGURA 4.62 - Representação esquemática do Ciclo celular..... 131

FIGURA 4.63 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na distribuição do ciclo celular de  
 células da linhagem A2780 Cis em diferentes concentrações (0,14, 0,28 e 0,56  
 $\mu$ M). Nível de significância \*\*\*\* $p < 0.0001$  utilizando ANOVA. Os dados foram  
 expressos em  $\pm$  DS (n=3). ..... 132

## LISTA DE TABELAS

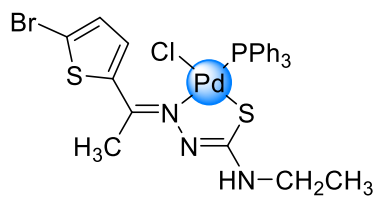
TABELA 3.1 - Reagentes usados na síntese sem purificação prévia. ....	33
TABELA 3.2 - Relação de volumes de DNA+Hoechst e complexo (Cx) utilizados na preparação dos tubos de ensaio.....	43
TABELA 4.1 - Caracterizações e análise elementar dos compostos.....	51
TABELA 4.2 - Atribuição dos estiramentos dos compostos por IV. ....	55
TABELA 4.3 - Atribuição das transições eletrônicas dos compostos. ....	58
TABELA 4.4 - Comprimento e ângulo das principais ligações para o composto CLET. ....	71
TABELA 4.5 - Dados cristalográficos para o complexo PdBr.....	73
TABELA 4.6 - Comprimentos de ligação selecionados para o complexo PdBr.	75
TABELA 4.7 - Principais ângulos selecionados para o composto PdBr. ....	76
TABELA 4.8 – Dados referentes as interações de hidrogênio identificadas na estrutura cristalina do complexo PdBr. ....	79
TABELA 4.9 - Dados de Espectrometria de massas para os complexos. ....	80
TABELA 4.10 - Medidas de condutividade para os complexos na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{M}$ em DMSO no intervalo de tempo de 0 a 48h. ....	91
TABELA 4.11 - Valores de constante intrínseca ( $K_b$ ) para os complexos. ....	95
TABELA 4.12 - Parâmetro de classificação por afinidade, gerado por ancoragem molecular. Software utilizado: Autodock 4.2.....	110
TABELA 4.13 - Valores de $IC_{50}$ para os ligantes obtidos a partir das concentrações de 0,8 a 100 $\mu\text{M}$ . ....	117
TABELA 4.14 - Valores de $IC_{50}$ para os complexos obtidos a partir das concentrações de 0,8 a 100 $\mu\text{M}$ . ....	118

## ESTRUTURA DOS LIGANTES E SIGLAS



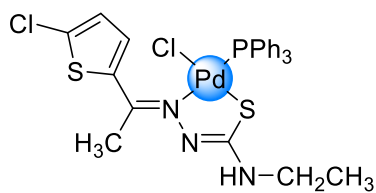


## ESTRUTURA DOS COMPLEXOS E SIGLAS



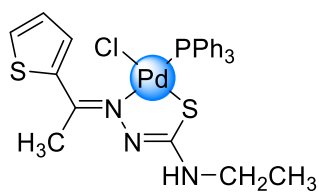
[PdCl(PPh<sub>3</sub>)(BRET)]

PdBr



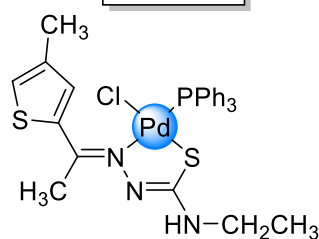
[PdCl(PPh<sub>3</sub>)(CLET)]

PdCl



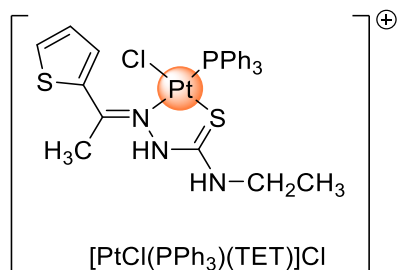
[PdCl(PPh<sub>3</sub>)(TET)]

PdT



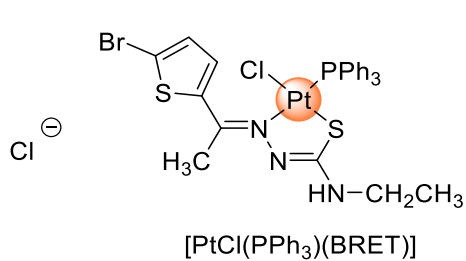
[PdCl(PPh<sub>3</sub>)(MET)]

PdCH<sub>3</sub>



[PtCl(PPh<sub>3</sub>)(TET)]Cl

PtT



[PtCl(PPh<sub>3</sub>)(BRET)]

PtBr

## RESUMO

COMPLEXOS DE Pd(II) E Pt(II) CONTENDO TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DO TIOFENO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MODO DE AÇÃO

Neste trabalho foram sintetizados dez ligantes e 4 complexos de paládio e 2 complexos de platina, os quais são inéditos, contendo tiossemicarbazonas derivadas do tiofeno com o intuito de avaliar o perfil citotóxico frente células tumorais. Todos os compostos foram caracterizados por condutividade molar, Ressonância Magnética Nuclear (RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , COSY, HMBC e HSQC), Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV), Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível, Análise elementar, Espectrometria de massas ESI/MS e Difração de raios X em monocristal (DRX). A partir do conjunto de técnicas foi possível verificar que os ligantes se coordenaram de forma bidentada aniônica, com exceção no complexo PtT o qual se coordenou de forma neutra, via átomos de nitrogênio e enxofre da tiossemicarbazona e os demais sítios são ocupados por um ligante clorido e uma trifenilfosfina. Os compostos foram submetidos a ensaios de estabilidade em DMSO, os quais sugeriram a permanência do ligante clorido na esfera de coordenação. Posteriormente a sua citotoxicidade foi avaliada pelo método MTT frente as linhagens celulares tumorais DU-145 (próstata), A549 (pulmão), MDA-MB-231 (mama), A2780 Cis (ovário) e não tumoral MRC5 (pulmão). Os ligantes se mostraram inativos em todas as linhagens celulares testadas enquanto os complexos se mostraram mais promissores frente as linhagens tumorais A549 e A2780 Cis. O composto PdT apresentou comportamento citostático frente a linhagem tumoral A549 enquanto o composto PdCH<sub>3</sub> exibiu comportamento citotóxico frente a linhagem tumoral A2780 Cis. Para explorar um possível alvo biológico, ensaios de interação com o DNA foram realizados. Indicando que os complexos interagiram com o DNA somente em altas concentrações (100 uM), além disso, sugerem que a via de

interação seja eletrostática e/ou via sulco com o DNA. Adicionalmente, estes compostos não foram capazes de inibir a ação das enzimas topoisomerase II $\alpha$  e II $\beta$ , porém os complexos de platina inibiram a topoisomerase I $\beta$  em todas as concentrações avaliadas (0,1-100  $\mu$ M). O composto mais promissor PdCH<sub>3</sub> proporcionou o acúmulo de células na fase sub-G1 do ciclo celular, o que pode ser indício de indução de apoptose. Ademais, este complexo foi capaz de inibir o fechamento de ferida em ensaios de Wound Healing, alterou significativamente a morfologia celular e reduziu a formação do número de colônias. Tais dados representam uma capacidade efetiva dos complexos de paládio em afetar a viabilidade celular de células cancerosas, indicando que as estruturas propostas apresentam propriedades biológicas promissoras.

## ABSTRACT

### Pd(II) AND Pt(II) COMPLEXES CONTAINING THIOSSEMICARBAZONES DERIVED FROM THIOPHENE: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, CYTOTOXICITY AND MODE OF ACTION INVESTIGATION

In this work, ten ligands and four palladium and two platinum complexes containing thiosemicarbazones derived from thiophene were synthesized in order to evaluate their cytotoxic profile against tumor cells. The compounds were characterized by molar conductivity, Nuclear Magnetic Resonance ( $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR, COSY, HMBC, and HSQC), Infrared (IR) Absorption Spectroscopy, Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy, Elemental analysis, ESI/MS Mass Spectrometry, and Single Crystal X-ray Diffraction (XRD). From the set of techniques, it was possible to verify that the ligands coordinated in an anionic bidentate form, with the exception of the PtT complex, which coordinated in a neutral form, via nitrogen and sulfur atoms of the thiosemicarbazone and the other sites are occupied by a chloride ligand and a triphenylphosphine. The compounds were subjected to stability tests in DMSO, which suggested the permanence of the chloride ligand in the coordination sphere. Afterwards its cytotoxicity was evaluated by the MTT method against the tumor cell lines DU-145 (prostate), A549 (lung), MDA-MB-231 (breast), A2780 Cis (ovary) and non-tumor cell line MRC5 (lung). The ligands were inactive in all cell lines tested, while the complexes were more promising concerning the A549 and A2780 Cis tumor lines. The most cytotoxic compound PdT showed cytostatic behavior against the A549 tumor lineage, while the PdCH<sub>3</sub> compound exhibited antimetastatic and cytotoxic behavior against the A2780 Cis cell line. To explore a possible biological target, DNA interaction assays were performed. These data indicate that the complexes interacted with DNA only at high concentrations (100  $\mu\text{M}$ ). Moreover, they suggest that the interaction pathway is electrostatic and/or via groove binding with DNA. Additionally, they could not inhibit the action of

topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$  enzymes. However, the platinum complexes inhibited topoisomerase I $\beta$  at all concentrations evaluated (0.1-100  $\mu$ M). The most promising compound, PdCH<sub>3</sub>, provided the accumulation of cells in the sub-G1 phase of the cell cycle, which may indicate induction of apoptosis. Furthermore, this complex inhibited wound closure in Wound Healing assays and significantly altered cell morphology. Such data represent an effective ability to affect the cell viability of cancer cells. These results indicate that the synthesized palladium compounds have an encouraging biological activity.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Câncer.....	1
1.2 - Fármacos a base de platina.....	3
1.3 - Tiossemicarbazonas .....	7
1.4 - Tiofeno .....	11
1.5 - Fármacos a base de paládio.....	15
1.6 - Complexos de paládio e platina derivados de tiofeno e tiossemicarbazonas.....	19
1.7 - Diferentes modos de coordenação de compostos derivados de tiofeno e tiossemicarbazonas.....	21
1.8 - Alvos biológicos.....	25
1.9 - Planejamento estrutural.....	29
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS .....	31
2.1 - Objetivo geral.....	31
2.1.1 - Objetivos específicos:.....	31
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1 - Solventes e Reagentes .....	33
3.2 - Síntese .....	33
3.2.1 - Síntese dos Ligantes.....	33
3.2.2 - Síntese do precursor $[PdCl_2(ACN)_2]$ : .....	34
3.2.3 - Síntese dos complexos $[MCl(L)PPh_3]$ : .....	34
3.2.4 - Síntese dos complexos $[M(DMSO)(L)PPh_3]$ :.....	35
3.3 – Instrumentação: .....	36
3.3.1 - Determinação do ponto de fusão:.....	36
3.3.2 - Análise Elementar: .....	36
3.3.3 - Condutividade Molar:.....	37
3.3.4 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho: .....	37
3.3.5 - Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível:.....	37
3.3.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: .....	37
3.3.7 - Estudo de estabilidade por RMN $^{31}P$ em DMSO e DMSO- D <sub>2</sub> O/DMEM: .....	38
3.3.8 - Estudos de estabilidade por UV-Vis: .....	38
3.3.9 - Estudo de estabilidade por Condutividade molar em DMSO:..	38
3.4 - Difração de Raios X: .....	38

3.5 – Espectrometria de Massas: .....	39
3.6 - Determinação da Lipofilicidade (logP).....	39
3.7 - Estudo de Interação com Biomoléculas .....	40
3.7.1 - Estudo de Interação com DNA: Ultravioleta-visível.....	40
3.7.2 - Estudo de Interação com DNA: Eletroforese em Gel .....	40
3.7.3 - Dicroísmo Circular.....	41
3.7.4 - Estudo de Interação com DNA-Viscosidade .....	42
3.7.5 - Ensaio de Fluorescência com Hoechst 33258.....	42
3.8 - Ancoragem molecular .....	43
3.9 - Estudo de interação com a Topoisomerase I e II: Eletroforese em gel	45
3.10 - Ensaio Celulares .....	46
3.10.1 - Ensaio de Viabilidade Celular.....	46
3.10.2 - Ensaio de Wound Healing.....	47
3.10.3 - Ensaio de Morfologia Celular .....	47
3.10.4 – Ensaio Clonogênico .....	48
3.10.5 - Análise do ciclo celular .....	48
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
4.1 - Síntese e caracterização dos compostos.....	49
4.2 - Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (FTIR):	52
4.3 - Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível: ..	55
4.4 – Ressonância Magnética Nuclear: .....	59
4.5 - Difração de raios X .....	68
4.5.1 - Interações intramoleculares e intermoleculares .....	76
4.6 - Espectrometria de massas: .....	79
4.7 - Coeficiente de Partição: .....	80
4.8 - Estudo de estabilidade.....	83
4.8.1 - Estudo de estabilidade em DMSO por RMN:.....	83
4.8.2 - Estudo de estabilidade por Ultravioleta-visível em DMSO:.....	85
4.8.3- Estudo de estabilidade por UV-Vis em acetona:.....	87
4.8.4 - Estudo de estabilidade por UV-Vis em DMSO sem luz:.....	89
4.8.5 - Estudo de estabilidade por Condutividade molar em DMSO:..	91
4.9 - Síntese dos complexos em DMSO:.....	91
4.10 - Estudo de interação com DNA.....	94
4.10.1 - Titulação Espectroscópica: .....	94
4.10.2 - Eletroforese em gel de agarose: .....	97
4.10.3 - Dicroísmo Circular (CD): .....	101
4.10.4 - Estudo de Interação com DNA-Viscosidade .....	103

4.10.5 - Ensaio competitivo com Hoeschst 33258:.....	105
4.11 - Ancoragem molecular .....	107
4.12 - Enzimas Topoisomerases .....	110
4.12.1 - Topoisomerase II $\alpha$ e II $\beta$ .....	110
4.12.2 - Topoisomerase I $\beta$ .....	114
4.13 - Ensaio celulares .....	116
4.13.1 - Ensaio de Citotoxicidade in vitro.....	116
4.13.2 - Ensaio de Migração Celular – Wound Healing (A549).....	119
4.13.3 - Ensaio de Morfologia Celular (A549) .....	122
4.13.4 - Ensaio de Migração Celular – Wound Healing (A2780 Cis) .....	124
4.13.5 - Ensaio de Morfologia Celular (A2780 Cis).....	125
4.13.6 – Ensaio de formação de colônias .....	128
4.13.7 – Avaliação do Ciclo Celular .....	129
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES .....	133
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
CAPÍTULO 7 - APÊNDICES.....	151



# Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Câncer

Neoplasia é o termo utilizado para descrever a proliferação descontrolada de células, este crescimento desordenado gera um acúmulo celular, o tumor, o qual pode ser benigno ou maligno. A definição científica de câncer se refere especificamente ao acúmulo celular maligno. O câncer representa um conjunto de doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células que sofreram mutações genéticas.<sup>1</sup> Como uma das consequências do comportamento anormal adquirido por células alteradas, ocorre uma maior necessidade de adquirir nutrientes para a manutenção e multiplicação celular, a qual transcorre de forma constante, devido a isso, surgem novos vasos sanguíneos em um processo denominado de angiogênese.<sup>2</sup>

As células cancerosas podem exibir a capacidade de se desprender do tumor primário e migrarem a tecidos vizinhos. A partir dessa migração, as células podem ter acesso ao interior de vasos sanguíneos ou linfáticos, e esses podem servir como meio de transporte para sua disseminação para órgãos distantes, dando origem a tumores secundários, sendo caracterizado como metástase, o qual está representado na Figura 1.1.<sup>2, 3, 4</sup>

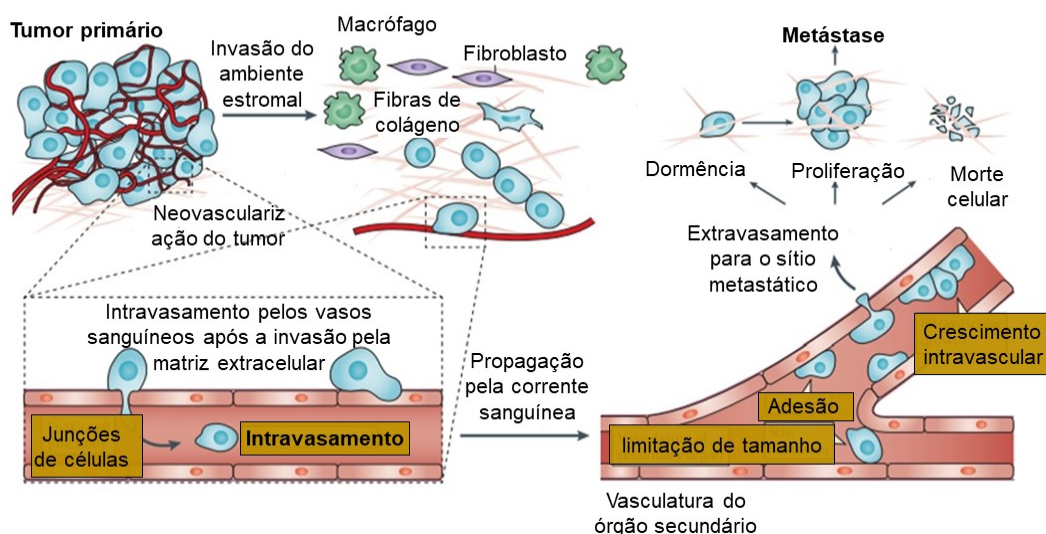


FIGURA 1.1 - Representação do processo de metástase.<sup>4</sup>

Os processos de angiogênese e metástase estão diretamente correlacionados, uma vez que o crescimento dos tumores é proveniente da vascularização. Desta forma, os fármacos capazes de inibir a angiogênese podem ser usados como agentes antineoplásicos, como o Bevacizumab empregado no tratamento de câncer colorretal.<sup>5</sup> A metástase é um dos fatores que dificultam o tratamento do câncer, uma vez que o material canceroso pode se espalhar por diversas partes do organismo. O número de casos de câncer vem crescendo ano a ano.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 625 mil casos novos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022, sendo que dentre os tipos mais incidentes estão os de mama correspondente a 66.280 mil casos novos e o de próstata referente a 65.840 mil casos novos. As incidências relacionadas aos demais tipos de câncer estão descritas na Figura 1.2. O câncer é responsável por uma alta mortalidade, o que é evidenciado pelos dados estatísticos provenientes do INCA, os quais revelaram que em 2019 o câncer de mama totalizou 18.068 óbitos, enquanto o câncer de próstata estava relacionado a 15.983 óbitos.<sup>6</sup>

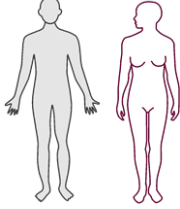
Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%		Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%		Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma nao Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma nao Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema nervoso central	5.220	2,3%

FIGURA 1.2 - Incidência de câncer no Brasil para o triênio 2020-2022.<sup>6</sup>

Os tipos de tratamento para o câncer se baseiam na cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia-alvo e o transplante de medula óssea. Dentre esses, os tipos de tratamento mais comuns se baseiam na cirurgia, a qual consiste na remoção dos tumores com eficácia, mas somente é indicada nos casos em que não há metástase. Já a radioterapia pode ser

aplicada em conjunto com a cirurgia para otimização do tratamento ou de forma isolada, podendo diminuir tumores grandes e as chances de metástase. A quimioterapia destaca-se pela sua efetividade, uma vez que pode ser aplicada em tumores localizados ou metastáticos. Essa consiste na administração de fármacos com a finalidade de exterminar somente as células neoplásicas preservando as normais. Porém, a maioria dos agentes antineoplásicos atuam de forma não-específica atingindo tanto células tumorais quanto células saudáveis, o que está diretamente relacionado com a presença dos efeitos colaterais. Uma classe de quimioterápicos de grande sucesso são os compostos a base de platina.<sup>1,7,8</sup>

## **1.2 - Fármacos a base de platina**

Dentre os compostos de coordenação atuantes como quimioterápicos, a cisplatina é o mais antigo e foi amplamente estudado devido a sua eficácia no tratamento do câncer de testículo representando uma taxa de cura de 90% nos casos diagnosticados na fase inicial. Adicionalmente, o fármaco se mostrou eficaz frente a outros tipos de câncer como de ovário, pulmão, colorretal, melanoma, dentre outros. Apesar de esforços científicos, o mecanismo de ação da cisplatina ainda não é totalmente elucidado, mas estudos indicaram que o composto ao entrar nas células por difusão passiva ou ativa, com o auxílio de transportadores de cobre, sofre sucessivas reações de hidrólise, gerando espécies metálicas mais susceptíveis a realizar reações com os alvos celulares. O processo de hidrólise somente é favorecido no meio intracelular devido à baixa concentração de cloreto como demonstrado na Figura 1.3.<sup>9</sup>

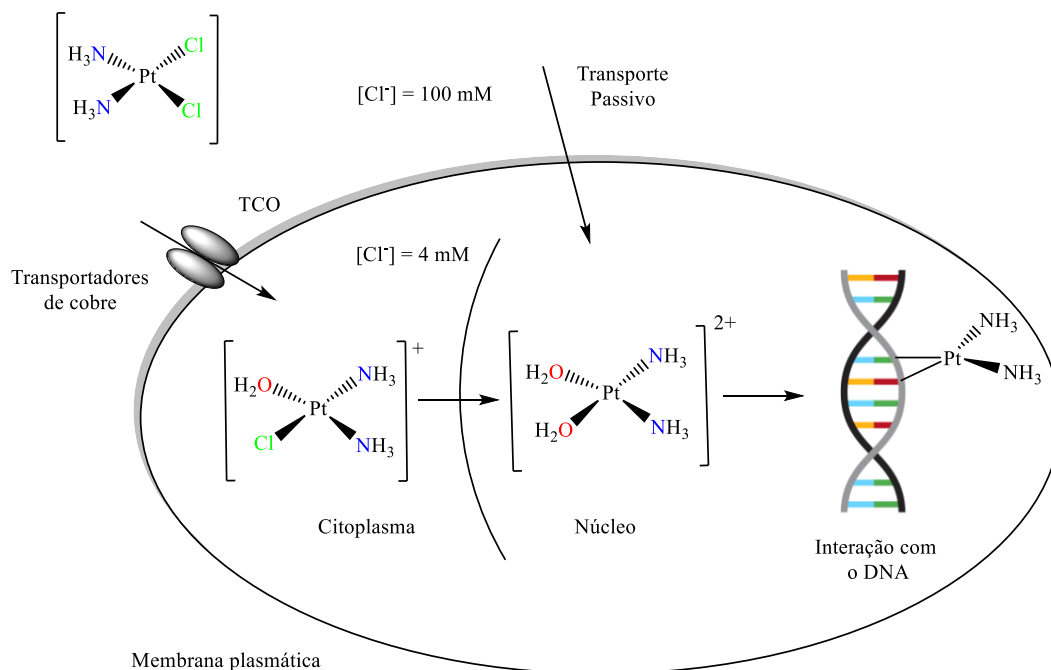


FIGURA 1.3 - Mecanismo de ação proposto para o fármaco Cisplatina.<sup>8</sup>

A alta eficácia citotóxica demonstrada pela cisplatina é oriunda da capacidade em estabelecer ligações covalentes com o DNA por meio dos átomos de N7 das bases purinas (G ou A) situados no sulco maior, os quais são considerados sítios preferenciais por serem mais acessíveis e mais nucleofílicos, quando comparados com os demais átomos de nitrogênio.<sup>9</sup> A partir dessas ligações formam-se adutos inter e intra-fita, os quais induzem mudanças conformacionais na dupla hélice. Essas mudanças são reconhecidas por algumas enzimas, as quais podem reparar estruturalmente o DNA ou desencadear o processo de apoptose.<sup>10</sup> Apoptose é um processo natural de defesa das células, que consiste em uma morte celular programada, funcionando como uma autodestruição. Este processo pode ser caracterizado por eventos morfológicos como condensação nuclear e citoplasmática. Isso leva a fragmentação das células em partículas fechadas por membranas, denominadas corpos apoptóticos, contendo organelas e porções do núcleo intactas. Estes corpos apoptóticos são então rapidamente reconhecidos, ingeridos e degradados por fagócitos

profissionais ou células vizinhas, o que impede processos inflamatórios indesejáveis como observados no processo de necrose.<sup>11</sup>

Apesar da citotoxicidade pronunciada da cisplatina, estudos mostraram que seu uso está vinculado ao desenvolvimento de resistência celular intrínseca ou adquirida durante o tratamento.<sup>12</sup> No primeiro caso, é proposto que os fatores que medeiam a resistência já estejam presentes em células tumorais, o que tornaria a terapia ineficaz. Já o processo de resistência adquirida é caracterizado pela ocorrência de mutações em células tumorais como consequência do tratamento, as quais podem ativar vias de sinalização compensatórias e impossibilitar resposta ao tratamento.<sup>13</sup>

Nesse contexto, o complexo de paládio derivado do 2-acetil piridina e 4N-etil tiossemicarbazona foi capaz de superar a resistência à cisplatina de células de câncer de ovário. O composto  $[Pd(Ac4Et)_2]$  apresentou  $IC_{50}$  de  $0,30 \pm 0,08$  ng/ml frente a linhagem tumoral de ovário SKOV-3, a qual exibe resistência intrínseca. Este também se mostrou promissor em relação a linhagem tumoral de ovário A2780cisR caracterizada por resistência adquirida à cisplatina, o qual exibiu  $IC_{50}$  de  $0,21 \pm 0,08$  ng/ml.<sup>14</sup>

Além da problemática de resistência celular, estudos evidenciaram que o uso da cisplatina também estava associado a efeitos colaterais adversos tais como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, dentre outros.<sup>12</sup> Esses fatores limitam o uso da cisplatina e instigam o desenvolvimento de novos compostos com a finalidade de contornar esses problemas.

Inicialmente os compostos eram muito semelhantes estruturalmente a Cisplatina, como a Carboplatina, a qual se diferenciava pela presença de um ligante dicarboxilato bidentado ao invés de átomos de cloro, os quais são ligantes lábeis. A substituição por um grupo de saída mais estável promoveu a redução da toxicidade, pois tornou a cinética de ativação do complexo mais lenta. Entretanto os adutos formados entre a carboplatina e o DNA necessitam de uma concentração

maior e são idênticos aos observados para a cisplatina. Nesse contexto, o desenvolvimento de outros análogos de platina mais estáveis, devido à presença de dois anéis quelatos, como a Oxaliplatina forneceu menos adutos de DNA do que a cisplatina e demonstrou uma atividade relativamente melhor em linhagens celulares resistentes. Vale ressaltar que Oxaliplatina também apresentou como vantagem o fato do seu uso não estar associado a efeitos colaterais como nefrotoxicidade.<sup>9,10</sup> Em trabalhos mais atuais, foi proposto que a oxaliplatina atua através de um mecanismo de ação distinto da cisplatina, no qual o DNA não é considerado alvo primordial da mesma. Os autores sugeriram que a perturbação da biogênese do ribossomo é funcionalmente importante para mediar a morte celular.<sup>15</sup>

Embora tenham surgido outros análogos da cisplatina, os quais estão representados na linha temporal da Figura 1.4, problemáticas semelhantes ainda permaneceram. A analogia estrutural *cis* entre a cisplatina e seus derivados é relevante, uma vez que foi visto que os compostos *trans* correspondentes apresentavam pouca ou nenhuma atividade antitumoral.<sup>16,17</sup>

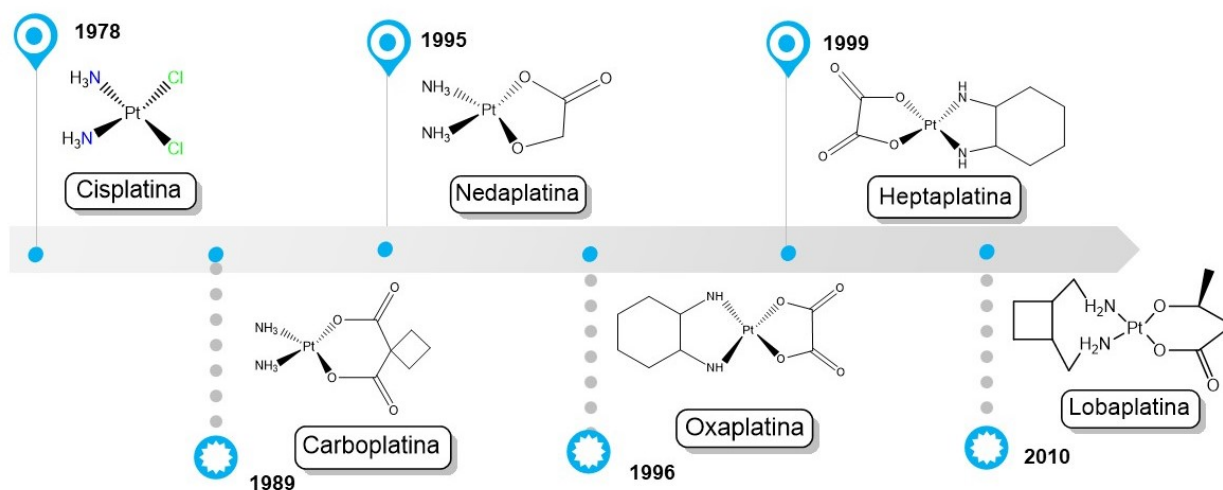


FIGURA 1.4 - Compostos a base de platina usados no tratamento de câncer.<sup>9</sup>

Em suma, estudos revelaram que efeitos colaterais como a nefrotoxicidade e a inativação do complexo antes mesmo de chegar ao DNA estão relacionados com a ligação entre o complexo de platina e proteínas ou peptídeos.<sup>16</sup> Preferencialmente, ocorre a ligação da platina com proteínas contendo o grupo tiol como a albumina (HSA) que é a mais abundante na corrente sanguínea humana. Estudos evidenciaram que as principais interações entre a cisplatina e a HSA envolve a ligação Pt-S da cisteína, uma vez que o metal é considerado um ácido mole de acordo com a teoria de Pearson e por isso tem uma maior afinidade com um átomo de enxofre, por ser uma base mole, ao invés do nitrogênio, pertencente as nucleobases do DNA.<sup>18,19</sup>

Além do centro metálico, a escolha dos ligantes é de extrema relevância na atividade anticâncer de agentes antineoplásicos, uma vez que esses são capazes de modular propriedades como reatividade e lipofilicidade dos compostos.<sup>20,21</sup> Dentre os ligantes promissores, destaca-se as tiossemicarbazonas por estarem presentes em agentes quimioterápicos potencialmente úteis para inibir as atividades das células cancerosas.<sup>22</sup>

### **1.3 - Tiossemicarbazonas**

As tiossemicarbazonas (TSC) pertencem a classe de moléculas orgânicas denominada de Bases de Schiff, as quais são constituídas por um grupo azometino (C=N). O mesmo é proveniente da reação de condensação entre uma amina primária oriunda da tiossemicarbazida e o grupo carbonila de um aldeído ou cetona, como elucidado na Figura 1.5.<sup>23,24</sup> Essa classe de compostos é interessante do ponto de vista científico e extensivamente exploradas, pois apresentaram uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacológicas consolidadas na literatura, tais como: antiviral, antibacteriana, antitumoral, antiprotozária, dentre outras.<sup>25,26</sup> É de amplo conhecimento que a aplicação das TSC não se baseia somente na área de química de coordenação, uma vez que podem ser usadas como reagentes e indicadores visuais na área de química

analítica, e comercialmente são usadas como corantes, em filmes fotográficos e na indústria têxtil.<sup>27</sup>

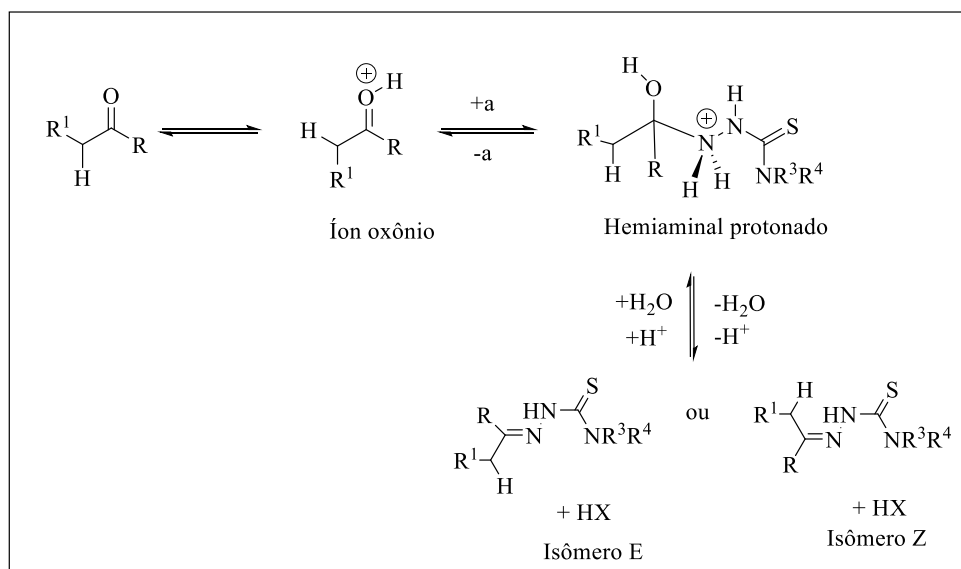


FIGURA 1.5 - Mecanismo de obtenção das tiossemicarbazonas.<sup>24</sup>

As tiossemicarbazonas são caracterizadas como sistemas com alta deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina, e por consequência podem coexistir na forma tiona ou tiol em equilíbrio tautomérico. Esta classe de compostos pode sofrer diversas modificações estruturais o que lhes confere uma alta versatilidade química e podem potencializar sua atividade biológica.<sup>24</sup>

Dentre os compostos derivados de tiossemicarbazonas, destaca-se o 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (3-AP) por ser uma das principais substâncias orgânicas promissoras frente a alguns tipos específicos de tumores, tais como: carcinoma de pulmão M-109 de ratos, carcinoma de ovário humano A2780 e leucemia L-1210. Esse sofreu algumas modificações estruturais como a inserção do grupo bezoil fosfato originando o composto triapina 3-AP conforme representado na Figura 1.6.<sup>28,29</sup> Tais modificações contribuíram para aumentar a solubilidade em água e conseqüentemente a sua biodisponibilidade oral, o que pode potencializar sua atividade em células tumorais M-109, O



composto 3-AP apresentou elevado potencial para se tornar um fármaco antitumoral, uma vez que se mostrou promissor em estudos clínicos de fase II. O provável mecanismo de ação desse fármaco é a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RR), mas também há evidências de inibição da topoisomerase II. O mesmo foi considerado um inibidor mais potente que a hidroxiuréia, o qual é um inibidor aprovado clinicamente.<sup>26,30,31</sup>

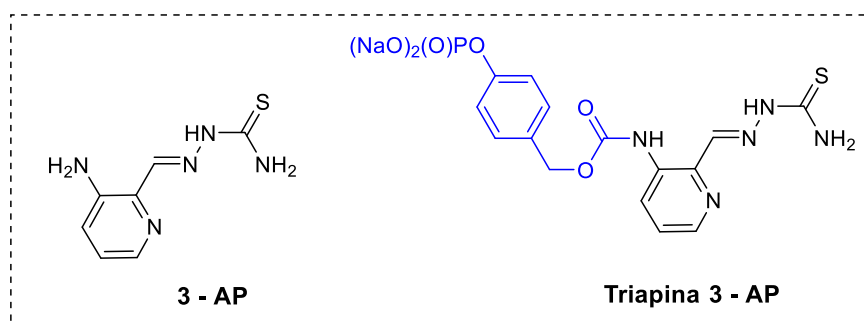


FIGURA 1.6 - Estrutura dos compostos 3 - AP e Triapina 3 - AP.

Diante da potencialidade das tiossemicarbazonas, a sua aplicação no desenvolvimento de compostos antineoplásicos é crescente. A Figura 1.7 apresenta algumas TSC promissoras frente a diversas linhagens celulares.<sup>32,33,34</sup>

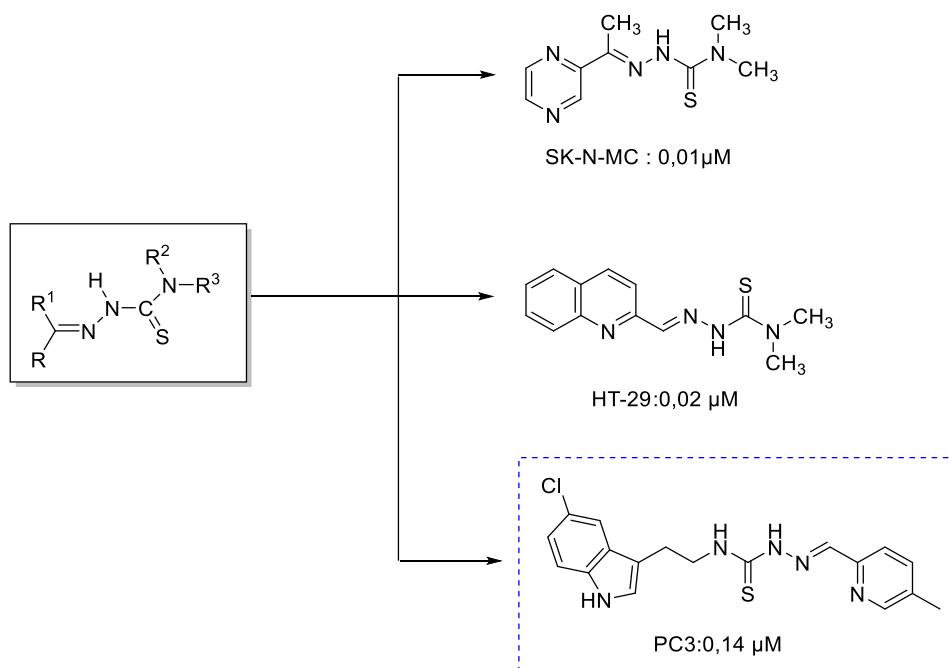


FIGURA 1.7 - Compostos derivados de tiossemicarbazonas com atividade anticâncer.

Dentre esses trabalhos, destaca-se o estudo de Zhangxu He e colaboradores desenvolvido em 2019, quando os compostos derivados de tiossemicarbazonas, ilustrados na Figura 1.8, foram avaliados em relação a sua atividade citotóxica frente a linhagem tumoral PC3, células de câncer de próstata humano. A partir dos resultados provenientes do estudo de reatividade-estabilidade foi evidenciado que os grupos retiradores de elétrons na posição 5 do indol, e a presença do grupo metil no anel fenila potencializaram a atividade citotóxica dos compostos. O composto 5j foi o mais promissor exibindo  $IC_{50}$  de 0,14  $\mu$ M, sendo mais ativo do que os compostos usados como padrão de atividade, 3-AP com  $IC_{50}$  de 0,56  $\mu$ M e DPC apresentando,  $IC_{50}$  de 0,12  $\mu$ M. O composto 5j, destacado em azul na Figura 6, foi capaz de induzir a apoptose e inibir a migração celular.<sup>32</sup>

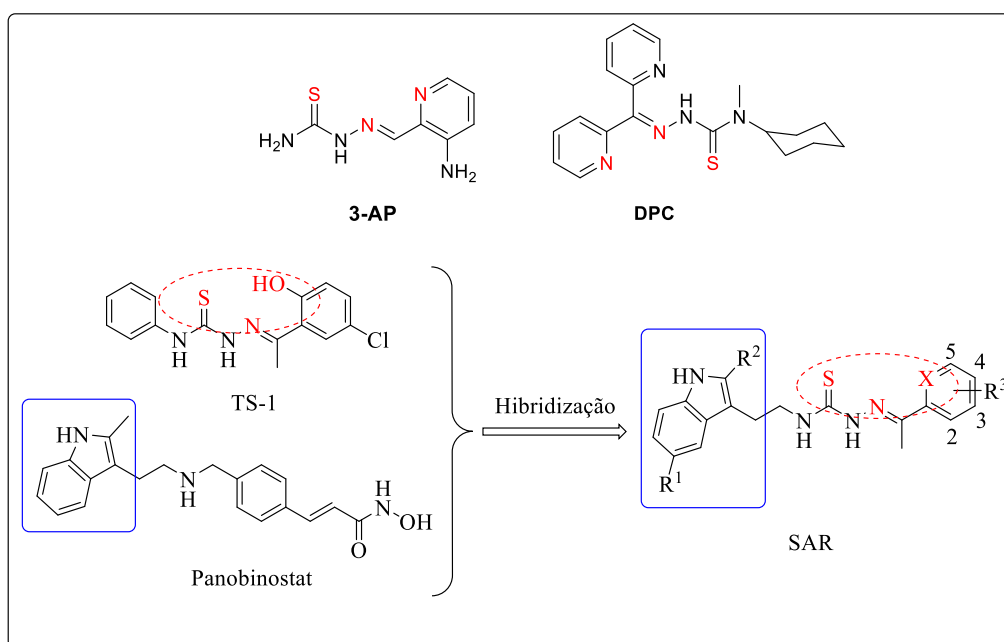


FIGURA 1.8 - Compostos de tiossemicarbazonas desenvolvidos por Zhangxu He et al.<sup>32</sup>

A literatura evidencia que a presença de um íon metálico tem potencializado a atividade citotóxica e tem contribuído de forma significativa para superar os efeitos colaterais dos compostos orgânicos originais.<sup>26,35</sup> Um dos motivos responsáveis pelo aumento da citotoxicidade em complexos é decorrente

da natureza polar das tiossemicarbazonas e sua interação com um íon metálico carregado resulta em uma estrutura na qual parte hidrofóbica da molécula fica exposta para o exterior e isso facilita a passagem do composto através da membrana celular.<sup>26</sup>

A atividade citotóxica apresentada pelos compostos derivados de tiossemicarbazonas estão correlacionadas com o seu modo de ação, o qual pode ser proveniente da inibição de enzimas como a topoisomerase II responsável pela replicação e transcrição do DNA ou a Ribonucleotídeo Redutase a qual é necessária para a síntese do DNA, provocando danos irreparáveis induzindo a morte celular. O mecanismo de ação das tiossemicarbazonas também pode estar associada a geração de espécies reativas de oxigênio.<sup>26</sup>

#### **1.4 - Tiofeno**

Uma grande parte das substâncias que atuam como fármacos são constituídas por heterocíclios, devido a sua ampla ação biológica, dos quais muitos são mundialmente consumidos. Eles constituem produtos de origem natural como vitaminas, hormônios, metabolitos ativos de vegetais, dentre outros.<sup>36</sup> Pode-se destacar os compostos contendo tiofeno, uma vez que esses apresentam um vasto perfil de atividades biológicas e farmacológicas, tais como anticâncer, antimicrobiano, anti-inflamatório, antidepressivo, analgésico, anticonvulsivante, dentre outras. Em relação a atividade anticâncer, muitos compostos de tiofeno descritos na literatura têm se comportado como agentes antineoplásicos promissores frente a diversas linhagens celulares conforme demonstrado na Figura 1.9.<sup>37,38</sup>

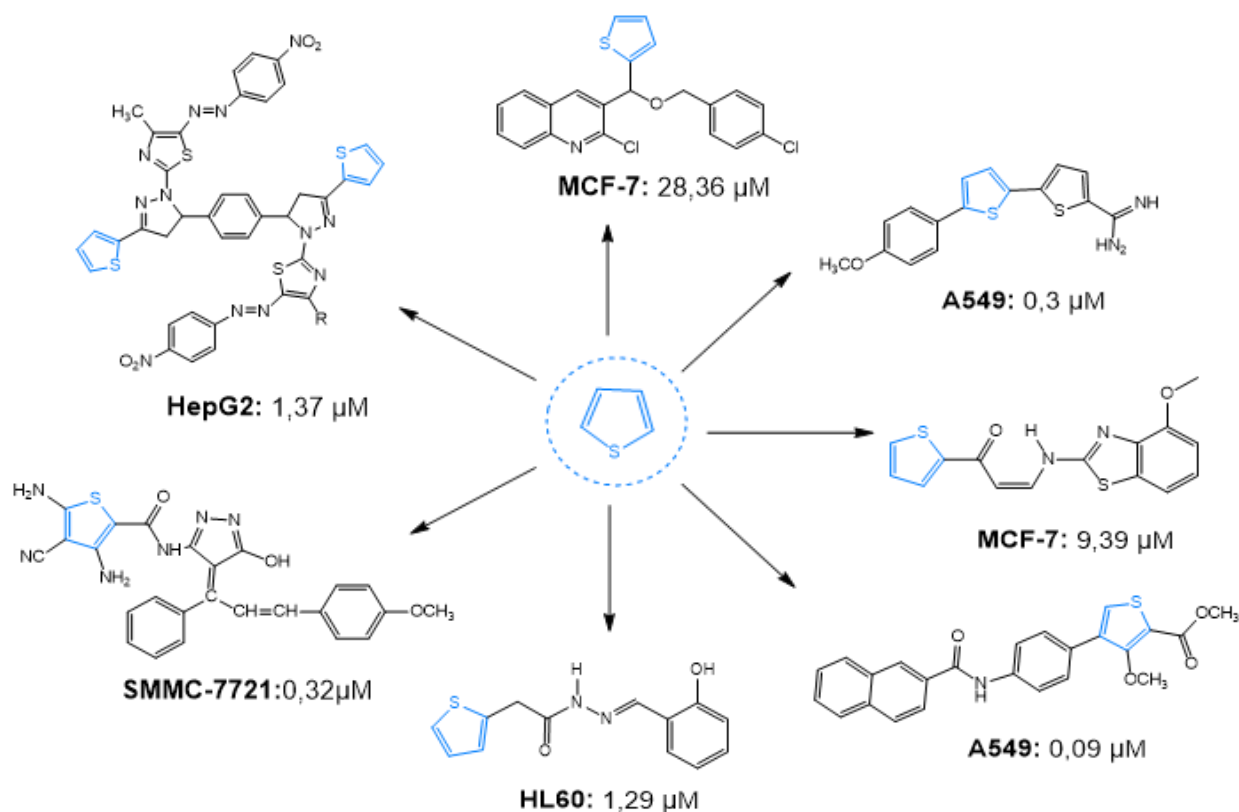


FIGURA 1.9 - Compostos derivados do heterociclo tiofeno com potencial atividade citotóxica.<sup>38</sup>

Diante do exposto, a atividade citotóxica promissora dos compostos a base de tiofeno tem nortado a busca por alternativas racionalizadas para modular estruturalmente compostos, com a finalidade de potencializar a citotoxicidade. Uma dessas alternativas é baseada na hibridização molecular do tiofeno com as tiossemicarbazonas. Essa é considerada uma alternativa promissora, uma vez que o heterociclo tiofeno encontra-se presente no fármaco comercial raltitrexed, Figura 9. Este composto é um análogo de folato de quinazolina, indicado para o tratamento do câncer colorretal (CCR). O mecanismo de ação deste fármaco é a inibição seletiva da enzima timidilato sintase, que leva à fragmentação do DNA e posterior morte celular.<sup>30</sup> Já as tiossemicarbazonas possuem atividade antitumoral comprovada e estão presentes na triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona, 3-AP), Figura 1.10, a qual é conhecida como a molécula mais promissora em estudos clínicos fase II.<sup>26,30,31</sup>

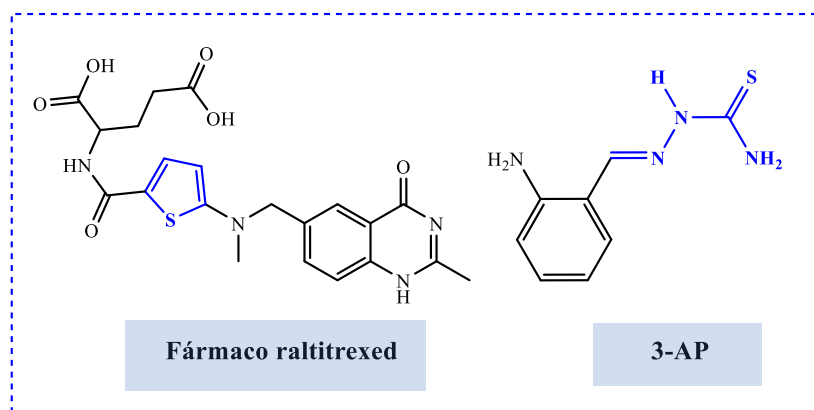


FIGURA 1.10 - Representação estrutural dos fármacos Raltitrexed e Triapina.<sup>30</sup>

A partir de trabalhos relatados na literatura, alguns dos quais estão representados na Figura 1.11, é evidenciado que a hibridização molecular entre o heterocíclico tiofeno e as tiossemicarbazonas tem contribuído na elaboração de agentes quimioterápicos capazes de afetar a viabilidade celular de células cancerosas.<sup>30,37,39,40</sup>

Um exemplo de destaque, é o trabalho desenvolvido por Zehra Tavsan e colaboradores em 2018, o qual demonstrou que os ligantes TSC<sup>1</sup> exibiram atividade citotóxica significativa em relação a linhagem celular OVCAR-3 (ovário humano) apresentando IC<sub>50</sub> de 16,60 µM. Interessantemente, o composto TSC<sup>1</sup> apresentou atividade equivalente ao seu complexo correspondente de rutênio, o qual exibiu IC<sub>50</sub> de 13,20 µM.<sup>39</sup> Os autores sugeriram que esse comportamento, provavelmente, seja devido a maior afinidade dos ligantes pelo DNA, apresentando maiores valores de constante intrínseca de ligação (K<sub>b</sub>).

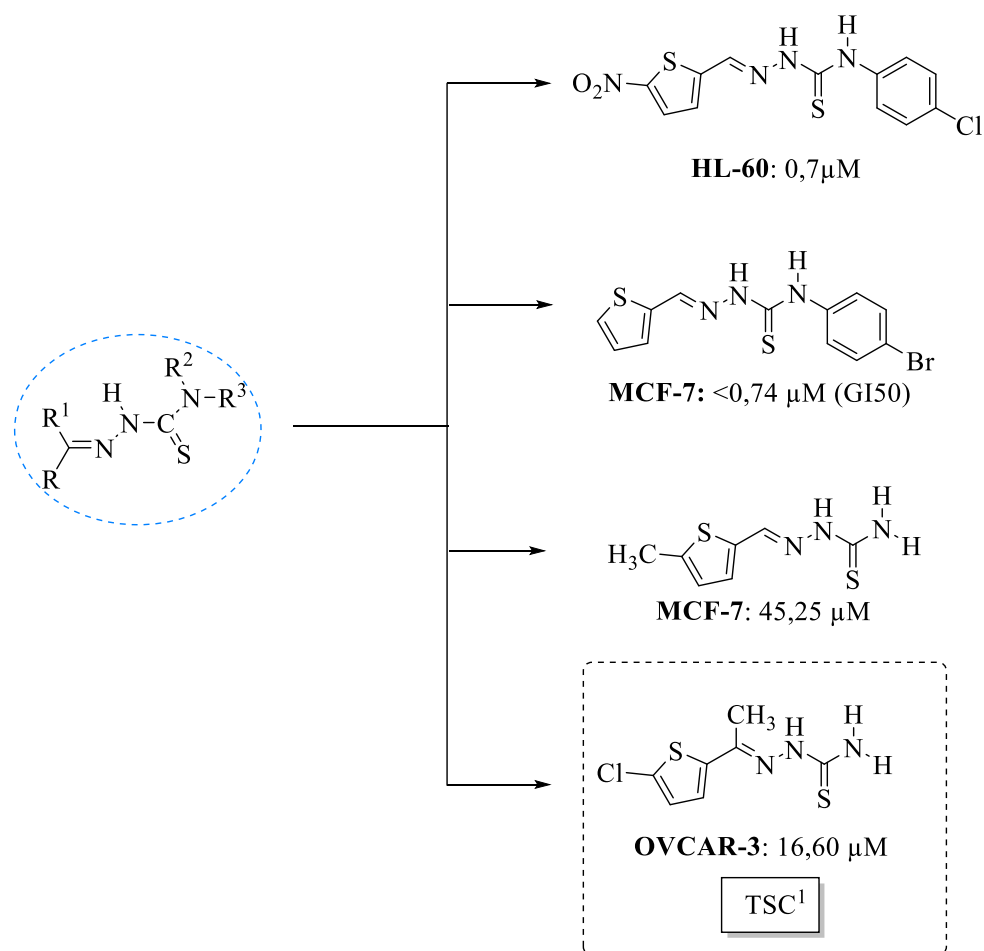


FIGURA 1.11 - Compostos derivados da hibridização molecular entre tiossemicarbazonas e o heterociclo tiofeno como antineoplásicos.<sup>30,37,39,40</sup>

O sinergismo das propriedades entre os ligantes e o centro metálico é de extrema relevância no planejamento de potenciais agentes antineoplásicos. Uma vez que a estabilidade termodinâmica do metal em ambientes biológicos não é somente determinada pelo estado de oxidação e geometria de coordenação, mas também pela estrutura tridimensional do complexo formado, pela estequiometria e disponibilidade das biomoléculas para coordenação.<sup>41</sup> Diante dos problemas apresentados pela cisplatina e seus derivados busca-se o desenvolvimento de compostos constituídos por outros centros metálicos, como por exemplo o paládio(II).

## 1.5 - Fármacos a base de paládio

Estudos indicam que complexos de paládio são mais solúveis e menos tóxicos que os seus análogos de platina.<sup>20</sup> Ademais, complexos de paládio derivados de tiossemicarbazonas têm se mostrado ativos em células tumorais resistentes à cisplatina, o que instiga a exploração destes como agentes antineoplásicos.<sup>22</sup> Além dessas vantagens, o paládio é considerado uma possibilidade interessante devido a sua semelhança química com a platina(II).

A semelhança entre a química de coordenação dos compostos de Pd(II) e Pt(II) se deve ao fato destes serem caracterizados como ácidos macios, apresentarem configuração eletrônica  $d^8$  e normalmente fornecerem complexos diamagnéticos com geometria quadrática plana. No entanto, esses se diferenciam principalmente em relação a cinética de reação de substituição de ligantes, sendo os complexos de paládio mais lábeis que seus análogos de platina. A velocidade de hidrólise de complexos de paládio é  $10^5$  vezes mais rápida que a da platina e conseqüentemente esses não conseguem manter sua estrutura intacta até atingir os alvos farmacológicos de interesse.<sup>20,42,43,44</sup>

Nesse contexto, a substituição de ligantes nos complexos com geometria quadrática plana se procede através do mecanismo associativo, no qual ocorre primeiramente a formação de um intermediário pentacoordenado, que é a etapa lenta e determinante da velocidade. Posteriormente ocorre liberação do grupo abandonador como pode ser visto na Figura 1.12.<sup>16,44,45</sup>

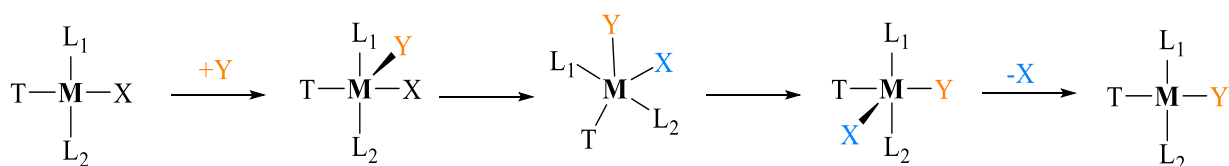


FIGURA 1.12 - Mecanismo associativo de substituição de ligantes em complexos  $d^8$ .

Em relação a conservação estrutural dos complexos de paládio, a escolha dos ligantes é fundamental pois contribuem com estabilidade cinética e

termodinâmica.<sup>21</sup> Sendo assim, uma das alternativas para modular as reações de substituição de ligantes consiste na inserção de ligantes menos lábeis e mais volumosos no arcabouço molecular. A inserção de fosfinas é uma promissora estratégia estrutural, uma vez que esses compostos apresentam caráter  $\sigma$ -doador e  $\pi$ -aceitador, o que os tornam bons ligantes espectadores para complexos de paládio(II). Esta estabilidade extra é proveniente da retrodoação da densidade eletrônica dos orbitais d, preenchidos do metal para os orbitais d vazios do átomo de fósforo, o que conseqüentemente fortalece a ligação metal-fósforo. Desta forma, os complexos têm uma maior probabilidade de manter sua integridade até atingir os alvos biológicos, sem que ocorra a dissociação destes ligantes. Adicionalmente, outra vantagem da utilização de fosfinas volumosas, tal como a trifenilfosfina, está correlacionada com o aumento de lipofilicidade do complexo, devido a presença dos 3 anéis aromáticos, o que pode auxiliar na permeabilidade através da membrana celular.<sup>46,47</sup>

De acordo com estudos descritos na literatura, a inserção de fosfinas como a trifenilfosfina no arcabouço molecular tem fornecido complexos de paládio com atividade citotóxica promissora como representados na Figura 1.13.<sup>48,49,50,51,52,53</sup>



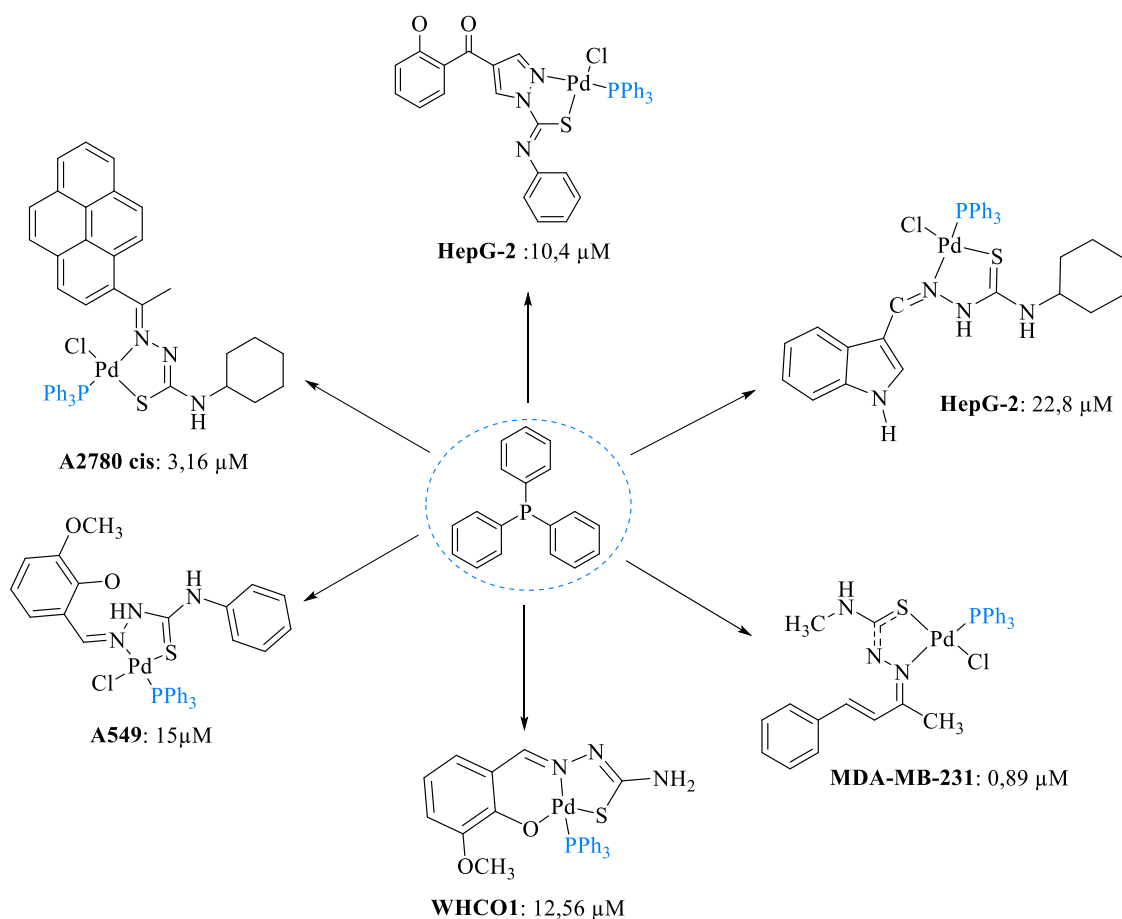


FIGURA 1.13 - Complexos antineoplásicos de paládio contendo trifenílfosfina. 48,49,50,51,52,53

Dentre esses trabalhos, destaca-se o estudo de Haribabu e colaboradores desenvolvido em 2018, no qual foi notável a potencialização da atividade citotóxica decorrente da inserção da trifenílfosfina em complexos de paládio, demonstrados na Figura 1.14, frente a linhagem tumoral HepG-2 (câncer de fígado humano). O composto 4 apresentou IC<sub>50</sub> de 22,8 μM, enquanto seu análogo sem a presença da fosfina exibiu IC<sub>50</sub> de 96,3 μM. Os autores realizaram estudos que indicaram que a citotoxicidade do composto está correlacionada com a capacidade deste em interagir de forma efetiva com o DNA, e induzir o processo de morte celular por apoptose.<sup>48</sup>

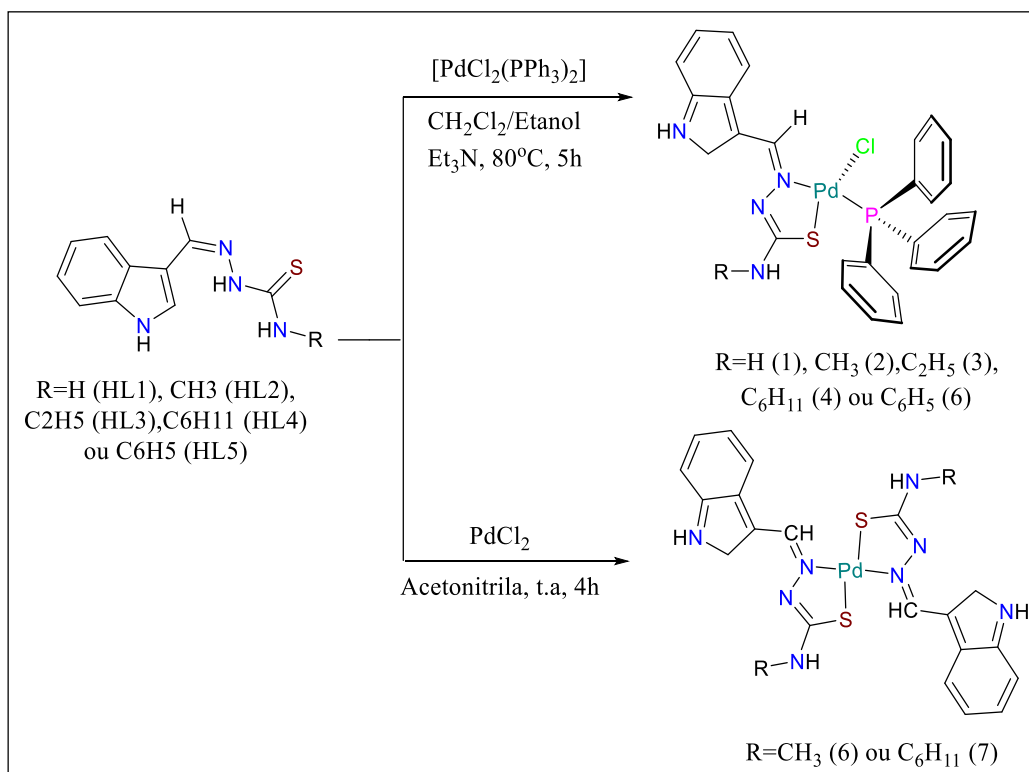


FIGURA 1.14 - Complexos de paládio desenvolvidos por Haribabu et al em 2018.<sup>48</sup>

Mais recentemente em 2020, o mesmo grupo de pesquisa desenvolveu outra classe de compostos contendo trifenilfosfina, representados na Figura 1.15, os quais mostraram resultados interessantes em relação a atividade citotóxica e uma seletividade dos compostos frente a linhagem tumoral HepG-2 (câncer de fígado humano). Os autores relataram que o composto 2 foi o mais citotóxico exibindo  $IC_{50}$  de  $10,4 \pm 3,2 \mu M$ , o qual demonstrou ser mais ativo do que o fármaco padrão avaliado (cisplatina), com valor de  $IC_{50}$  de  $21,5 \mu M$ . Estudos com citometria de fluxo e microscopia confocal indicaram que o composto 2 foi capaz de provocar a apoptose e induzir a parada do ciclo celular na fase G1.<sup>51</sup>

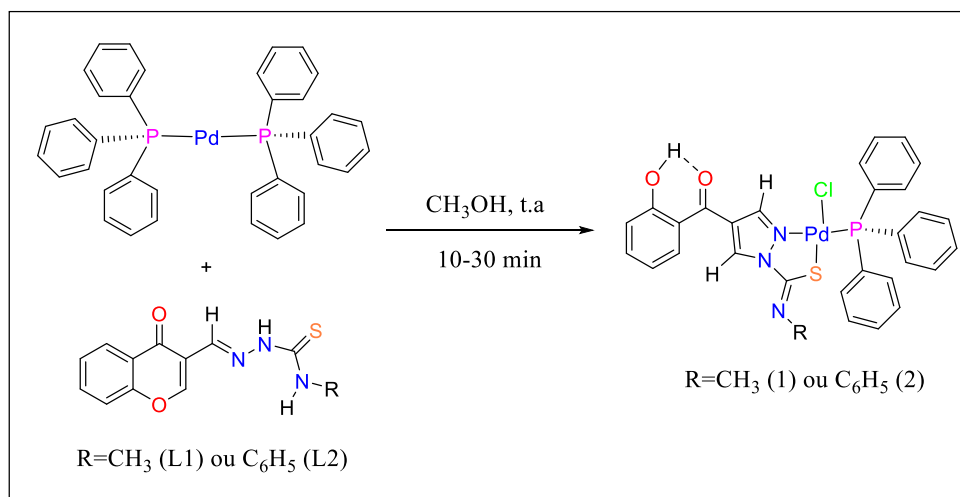


FIGURA 1.15 - Complexos de paládio com trifenilfosfina por Haribabu em 2020.<sup>51</sup>

Outra estratégia estrutural que contribui para aumentar a estabilidade dos complexos de paládio se baseia na utilização de ligantes quelantes contendo átomos N, S-doadores como as tiossemicarbazonas.

## 1.6 - Complexos de paládio e platina derivados de tiofeno e tiossemicarbazonas

Nesse contexto, Karaküçük- Iyidogan e colaboradores em 2011 estudaram a atividade citotóxica de complexos de Pd(II) e Pt(II) derivados de tiossemicarbazonas a partir do tiofeno-2-carboxaldeído com diferentes substituintes na posição 5, os quais foram sintetizados conforme a Figura 1.16. Em relação ao estudo de estrutura-atividade, o composto contendo o grupo nitro no anel tiofeno e o grupo fenil sem substituição na porção da tiossemicarbazona se mostrou mais promissor frente a todas as linhagens testadas. O complexo de platina referente ao ligante 5-nitrotiofeno 2-carboxaldeído-N (4) fenil tiossemicarbazona (4a) apresentou a maior atividade citostática contra o câncer cervical (HeLa), exibindo  $\text{IC}_{50}$  de  $1,7 \mu\text{M}$ .<sup>54</sup> Entretanto, foi visto que o seu análogo de paládio exibiu citotoxicidade menor.

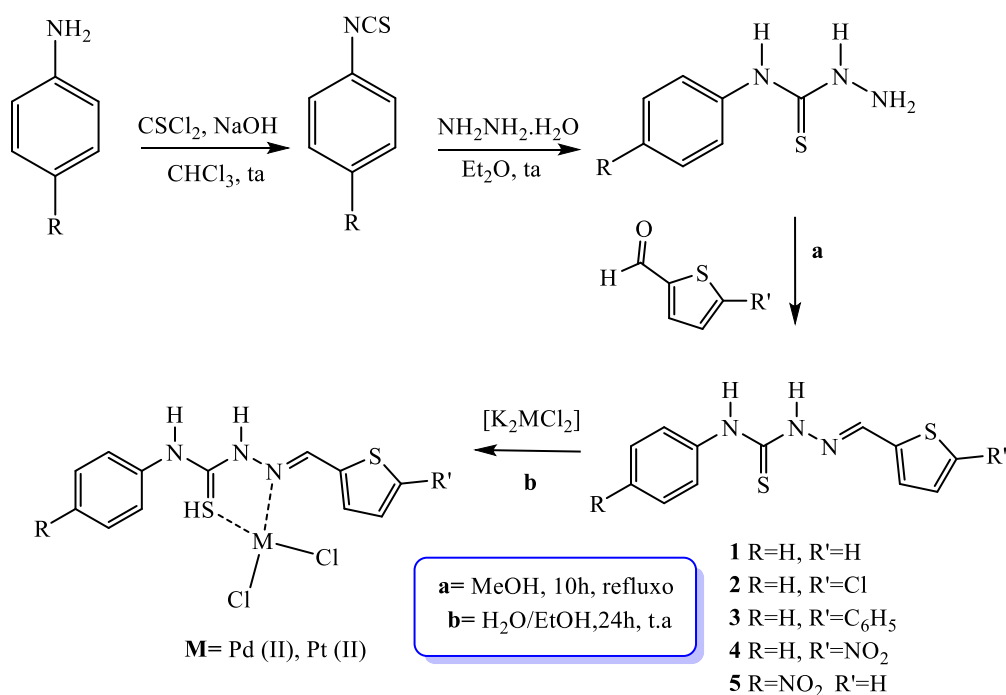


FIGURA 1.16 - Complexos de Pd(II) e Pt(II) constituídos por tiossemicarbazonas e tiofeno.<sup>54</sup>

Mais recentemente (2019) o composto 5 também foi explorado por Marques e colaboradores, reforçando seu potencial antineoplásico. Os dados mostram valores de IC<sub>50</sub> entre 0,5 e 1,9 µg mL<sup>-1</sup> para as linhagens celulares testadas, sendo mais promissor em relação a HL-60 (Leucemia Mielóide Aguda). Estudos inferiram que o composto interage com o ct-DNA (Calf thymus) via modo intercalativo e que o mesmo foi capaz de proporcionar um aumento significativo de células na sub-fase G1, indicando um processo de apoptose. No entanto, o composto só foi capaz de provocar uma leve inibição da enzima topoisomerase II na concentração de 100 µM.<sup>37</sup>

Os complexos sintetizados por Mbugua e colaboradores em 2020 são semelhantes estruturalmente aos propostos no presente projeto. Diferenciando, principalmente, em relação a natureza do substituinte da tiossemicarbazona (Figura 1.17). O complexo C1 foi o mais citotóxico frente a todas as células avaliadas se mostrando mais promissor em relação a linhagem tumoral de mama (MCF7), exibindo valor de IC<sub>50</sub> de 1,9 µM.<sup>55</sup>

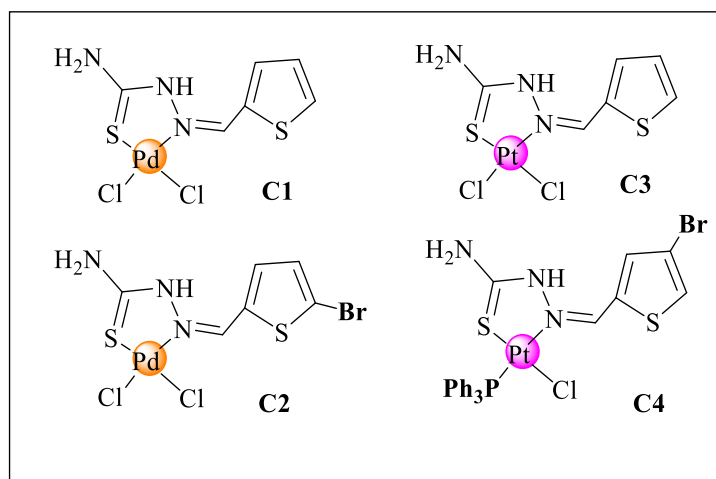


FIGURA 1.17 - Estrutura dos complexos sintetizados por Mbugua et al. em 2020.<sup>55</sup>

A relação entre a estrutura e atividade forneceu indícios de que a inserção do grupo brometo na posição 5 do anel tiofeno não favoreceu a atividade citotóxica, tanto dos complexos de paládio, quanto dos complexos de platina. Além disso, os autores salientam que após a inserção da trifenilfosfina no arcabouço molecular ocorre uma diminuição da citotoxicidade e que isso, provavelmente, esteja relacionado com o impedimento estérico que impede ou dificulta a labilização do grupo cloreto. Desta forma, a partir das observações foi proposto que a citotoxicidade estaria diretamente relacionada com a labilização dos ligantes cloretos. Os valores de constante intrínseca de ligação ( $K_b$ ) forneceram indícios de interação intercalativa entre os compostos e o ct-DNA, caracterizada por um efeito hipocrômico juntamente com um deslocamento batocrômico ou hipsocrômico.<sup>55</sup>

## 1.7 - Diferentes modos de coordenação de compostos derivados de tiofeno e tiossemicarbazonas

O modo de coordenação mais comum descrito na literatura para compostos derivados de tiossemicarbazonas é a coordenação bidentada aniônica via átomos de nitrogênio e enxofre. Entretanto alguns trabalhos evidenciaram

outros tipos de coordenação na presença do heterociclo tiofeno, os quais encontram-se representados na Figura 1.18.<sup>40,56,57,58,59,60</sup>

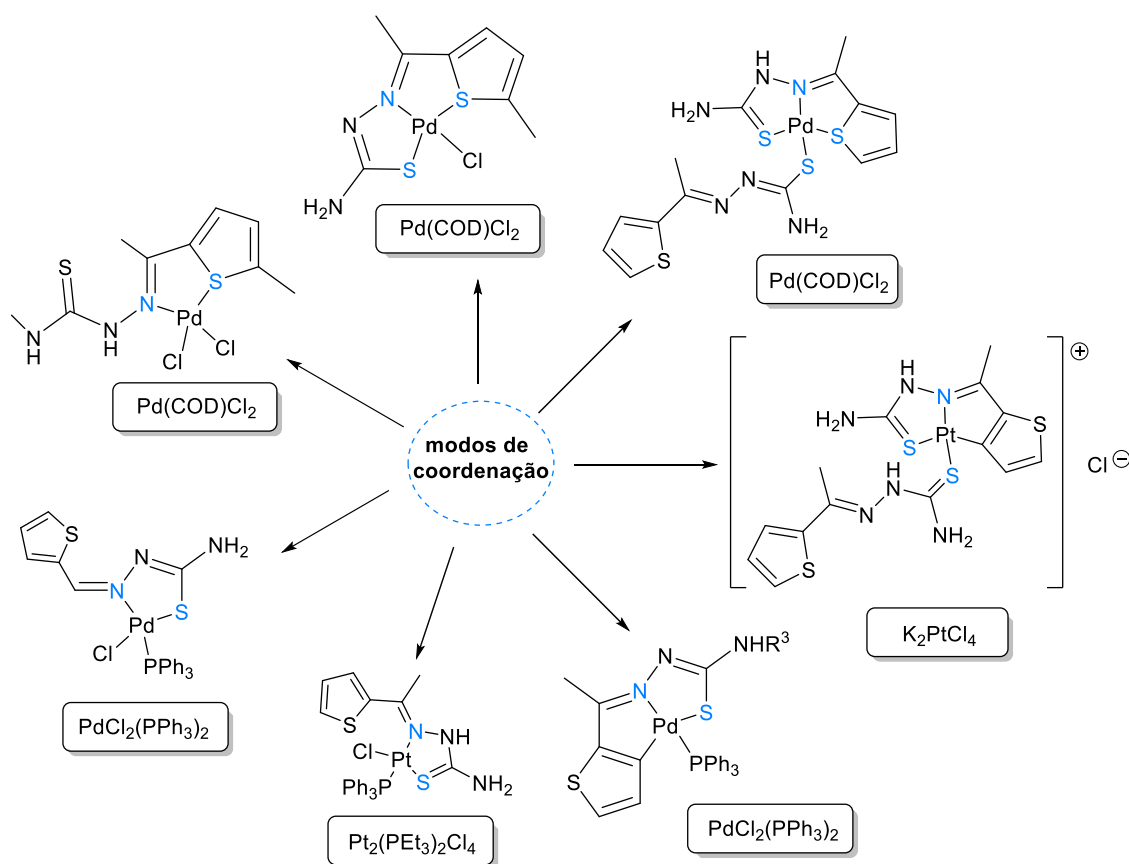


FIGURA 1.18 - Modos de coordenação possíveis para compostos derivados de tiosemicarbazonas e tiofeno.<sup>40,56,57,58,59,60</sup>

O trabalho de Eunice A. Nyawade e colaboradores desenvolvido recentemente, em 2021, relatou uma coordenação bidentada via átomo de nitrogênio azometino e enxofre do tiofeno fornecendo a formação de um anel quelato de cinco membros. Esse modo de coordenação foi sugerido pelos autores a partir do deslocamento do estiramento C-S do tiofeno para uma frequência mais baixa quando comparado com o estiramento no ligante. Essa evidência foi suportada pela observação de uma nova banda Pd-S, atribuída a formação da nova ligação. Corroborando com esse resultado, o estiramento C=S não apresentou deslocamento significativo após a complexação. Adicionalmente, foi visto por RMN que os sinais referentes aos hidrogênios do tiofeno se tornaram mais

desblindados, indicando um possível efeito indutivo retirador de densidade eletrônica, referente a coordenação, além o surgimento de uma banda em 483 nm associada a uma transferência de carga ligante-metal observada no espectro de Ultravioleta-visível.<sup>40</sup>

Tal comportamento foi notado para o composto C2, cujo substituinte na tiossemicarbazona é um grupo metila. Entretanto, quando o substituinte na tiossemicarbazona era uma amina foi observado que o ligante se coordenou de forma tridentada ao centro metálico nas mesmas condições de reação como exemplificado na Figura 1.19.<sup>40</sup>

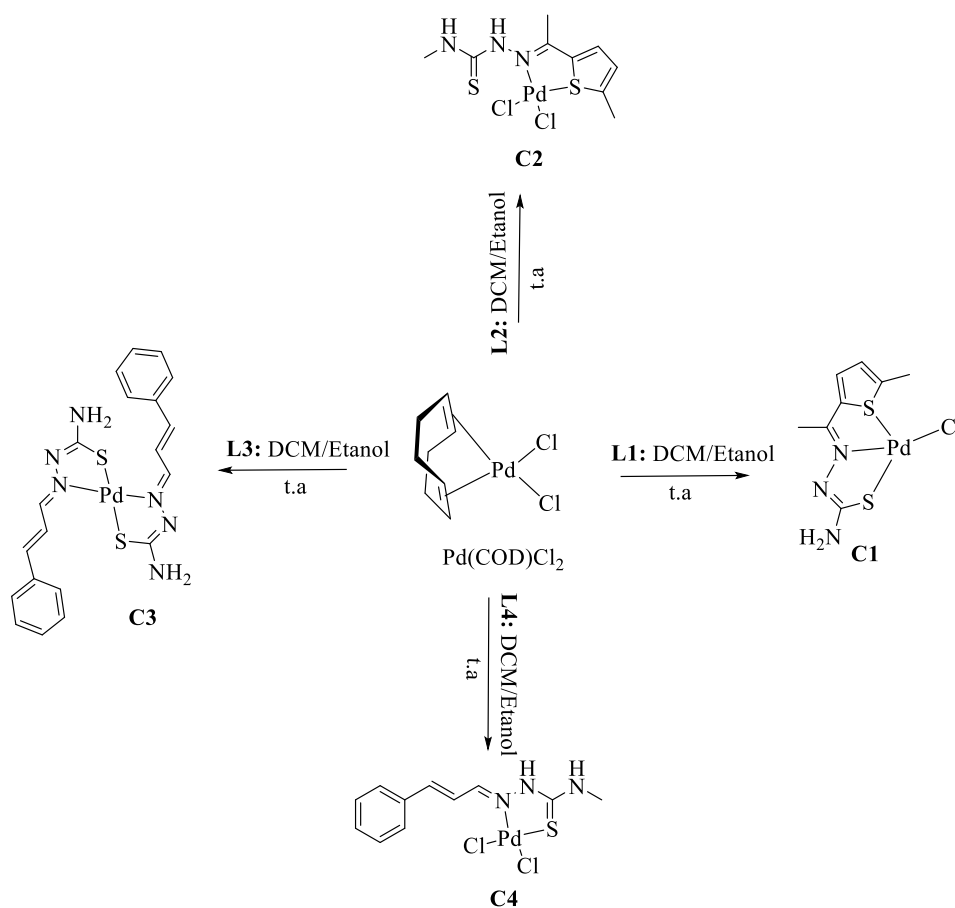


FIGURA 1.19 - Complexos de paládio sintetizados por Nyawade et al. em 2021.<sup>40</sup>

A Figura 1.18 também apresenta alguns compostos que sofreram ciclometalação proveniente da ativação da ligação C-H mediada por metal, resultando em uma estrutura cíclica. Este processo ocorre facilmente com espécies

de paládio(II), gerando paladaciclos que podem ser utilizados como catalisadores, em reações de acoplamento C-C, na síntese de heterociclos.<sup>58</sup>

Nesse contexto, Lobana e colaboradores em 2012 verificaram a ativação da ligação C-H em compostos derivados do heterociclo tiofeno e tiossemicarbazonas, fornecendo complexos ciclopaladados. A partir desse trabalho foi visto que quando o grupo R1 é um tiofeno e o grupo R2 é uma metila ou fenila, ambos ligados ao C2 das tiossemicarbazonas, a natureza do grupo R2 é determinante no processo de ciclopaladação. Desta forma, os autores atribuíram a ciclometalação ao efeito estérico dos substituintes R2, uma vez que não era observado a ciclometalação na presença de hidrogênio como substituinte R2. Sendo assim, uma das principais características que reforçam a suposição da formação da ligação Pd-C é o desaparecimento do sinal de hidrogênio (H4) do tiofeno nos espectros de RMN de H para o complexo.<sup>60</sup>

Os autores sugeriram que ausência de ciclometalação era decorrente da formação de interações intramoleculares curtas entre o átomo de enxofre do tiofeno e o átomo de nitrogênio hidrazinico desprotonado, inibindo a disponibilidade do tiofeno para ciclopaladação como representado na Figura 1.20. A partir da investigação desses compostos também foi observado que os substituintes em N1 não parecem influenciar a ciclometalação ou o comportamento de coordenação dos tio-ligantes sob investigação nos complexos 1-6.<sup>60</sup>



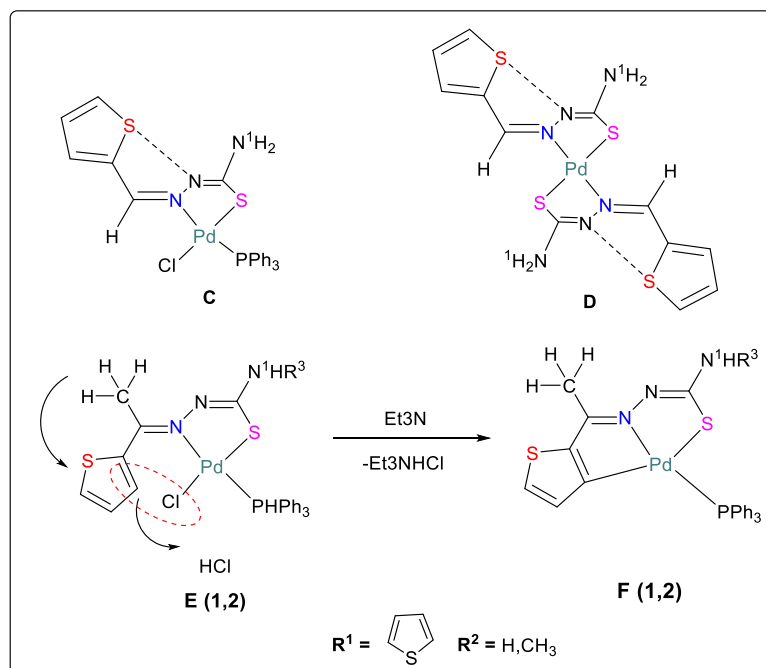


FIGURA 1.20 - Ciclometalação de compostos de paládio observada por Lobana et al. em 2012.<sup>60</sup>

A ciclopaladação em compostos derivados de tiossemicarbazonas contendo trifenilfosfina e cloreto no arcabouço molecular também é descrita por Paul e colaboradores em 2013. Os compostos estudados se diferem dos descritos anteriormente pela presença de um grupo fenil ao invés do tiofeno. Porém, os autores relataram comportamentos semelhantes, sendo que quando os compostos eram constituídos por grupos mais volumosos como metila e fenila ( $R^2$ ), esses impediam a mudança geométrica proveniente da rotação da ligação azometina ( $C=N$ ), favorecendo a ciclometalação. No estudo foi proposto que a obtenção da ligação Pd-C procede através da formação de um intermediário.<sup>61</sup>

## 1.8 - Alvos biológicos

Os complexos que atuam como agentes quimioterápicos usados atualmente apresentam a capacidade de se ligar ao DNA e essa interação pode se proceder de diferentes formas, como elucidado na Figura 1.21. As interações podem ser de natureza covalente através da ligação direta do complexo as bases

nitrogenadas ou aos grupos fosfatos do DNA, esses também podem interagir de forma não-covalente por meio de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas no sulco menor/maior do DNA ou através da intercalação. O sinergismo entre as propriedades eletrônicas e estruturais dos ligantes que constituem os complexos são determinantes no tipo de interação existente como, por exemplo, ligantes planares e ricos em elétrons  $\pi$  favorecem uma interação intercalativa.<sup>62,63,64</sup> Portanto, a investigação da capacidade de interação entre compostos de coordenação com o DNA é algo primordial para compreensão de um possível modo de ação.

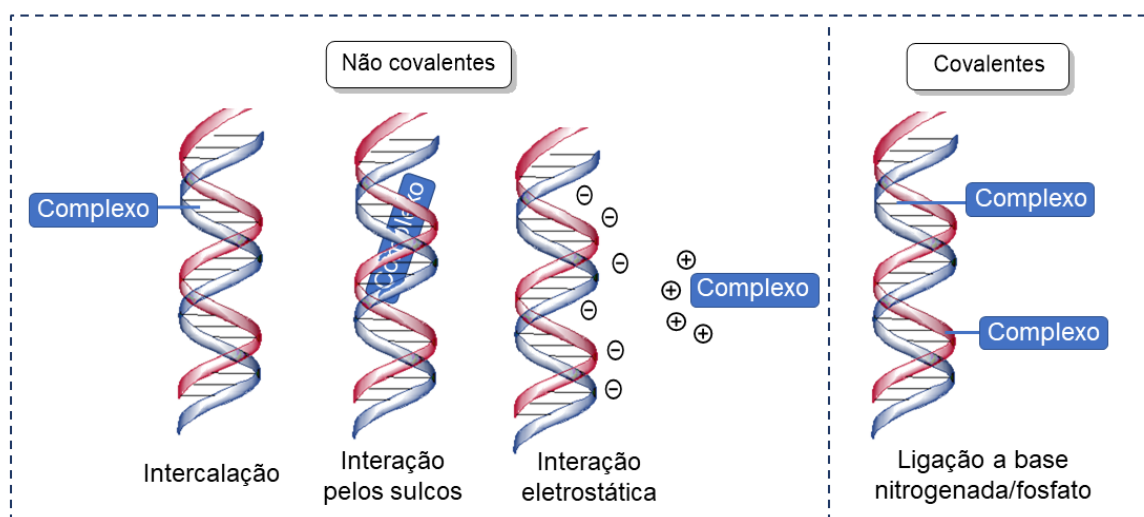


FIGURA 1.21 - Interações possíveis entre os complexos e o DNA. Fonte: adaptada da literatura.<sup>62</sup>

No entanto, tendo em vista os efeitos colaterais, a resistência celular e a possibilidade da inativação de compostos pela interação com enzimas ou proteínas, apresentados pelos fármacos atuais, novas propostas estruturais são desenvolvidas visando um mecanismo de interação alternativo com o DNA e ou com outros alvos biológicos em potencial.<sup>65</sup>

As informações contidas nas hélices de DNA precisam ser acessadas para a progressão de vários processos que garantem o funcionamento do organismo. Para que isso seja possível é necessário a separação das fitas de forma

temporária ou permanente. Porém, essa separação provoca supertorções na estrutura do DNA podendo induzir a quebra de suas fitas de forma irreversível, o que danifica a biomolécula e induz a morte celular. Desta forma, as enzimas topoisomerases são responsáveis por amenizar as tensões permitindo a ocorrência dos processos de transcrição e replicação do DNA, bem como a condensação e segregação cromossômica.<sup>66</sup>

Diante da notável relevância fisiológica das enzimas topoisomerases, essas têm sido consideradas como um alvo em potencial para diversos compostos. Estas enzimas são classificadas em tipo I e II, sendo que a topoisomerase I promove uma quebra simples em uma das fitas do DNA, processo no qual não é necessário o uso de ATP. Dentre os diferentes tipos de topo I existentes, a subfamília IB (humana) apresenta níveis altos em todas as células, mas especialmente em células de rápida proliferação como as células cancerosas, e devido a isso são considerados alvos terapêuticos relevantes. Já a topoisomerase II rompe ambas as fitas e passa uma hélice intacta através de uma quebra transitória de fita dupla no DNA, utilizando ATP como fator energético, viabilizando o relaxamento da forma enovelada do plasmídeo (Figura 1.22).<sup>67</sup> Após a passagem do filamento, as fitas são religadas e a estrutura do DNA é restaurada.

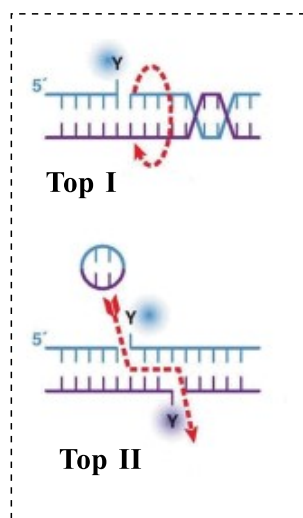


FIGURA 1.22 - Diferenças na atividade das enzimas.<sup>68</sup>

A topoisomerase II é encontrada na forma de duas isoformas,  $\alpha$  e  $\beta$ , as quais se diferem em sua produção durante o ciclo celular. Sendo assim, a topoisomerase  $\alpha$  é encontrada em elevada expressão em células que se proliferam rapidamente como as tumorais e por isso é um alvo interessante para fins antineoplásicos. Já a topoisomerase  $\beta$  independe do ciclo celular, pois esta não mostra alterações significativas em sua expressão, além disso, a interação com essa isoforma está associada ao surgimento de tumores secundários. Por isso, é de extrema importância a seletividade entre as isoformas.<sup>69</sup>

De acordo com estudos descritos na literatura, alguns compostos quimioterápicos podem atuar como venenos da topoisomerase II, os quais são responsáveis por potencializar a atividade da enzima ao formar uma ligação covalente entre topo-DNA e conseqüentemente gerando um aumento das quebras da biomolécula, assim tornando a enzima em uma potente toxina celular. Desta forma, os venenos como o etoposídeo representado na Figura 1.23, podem inibir a capacidade da enzima de religar o substrato clivado desencadeando o aumento do nível de complexos de clivagem (topo-DNA) e induzindo a morte celular.<sup>69,70</sup>

A grande problemática dos venenos consiste em não diferenciar as topoisomerase II $\alpha$  da II $\beta$ , assim a apoptose é induzida em todas as células, não sendo seletiva em células tumorais, e conseqüentemente promovendo inúmeros efeitos colaterais. Por isso, busca-se o desenvolvimento de compostos que atuem como inibidores catalíticos, os quais são capazes de evitar a ligação da topoisomerase ao DNA evitando a formação do complexo de clivagem ou inibir a função da enzima inviabilizando o relaxamento do plasmídeo.<sup>71,72,73,74,33</sup>

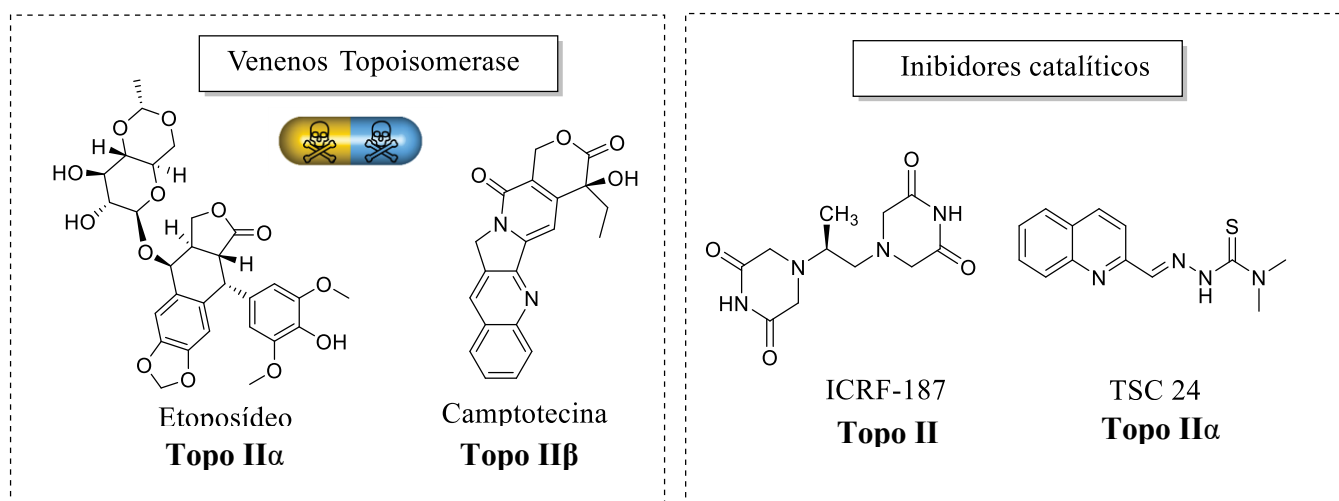


FIGURA 1.23 - Exemplos de alguns venenos e inibidores catalíticos das enzimas topoisomerases.<sup>71,72,73,74,33</sup>

## 1.9 - Planejamento estrutural

Diante do exposto, os compostos de interesse foram planejados considerando algumas estratégias racionalizadas com a finalidade de auxiliar na conservação estrutural, apresentada na Figura 1.24. Uma das estratégias consiste na inserção de trifenilfosfina no arcabouço molecular, o que fornece um aumento da lipofilicidade dos compostos, podendo facilitar a permeabilidade na membrana celular, elevando sua atividade citotóxica.<sup>75</sup>

A inserção de ligantes volumosos como a trifenilfosfina dificultam a formação de um intermediário pentacoordenado por impedimento estérico, o que conseqüentemente diminui a cinética de reações de substituição pelo mecanismo associativo. Além disso, a trifenilfosfina estabiliza o centro metálico devido ao processo de retrodoação fortalecendo a ligação metal-fósforo, o que favorece a formação de complexos mais estáveis. Adicionalmente, a trifenilfosfina apresenta a capacidade de ocupar bolsões hidrofóbicos nos sítios de várias enzimas, o que auxilia na estabilização do complexo paládio-enzima e exibe atividade citotóxica frente a alguns tumores, o que reforça ainda mais a relevância de sua inserção no desenvolvimento de possíveis agentes antineoplásicos.<sup>45,46,76</sup>

A variação do centro metálico foi realizada com a finalidade de investigar a influência destes frente a atividade citotóxica, e verificar se os resultados experimentais forneceriam indícios em relação ao papel do metal, se o mesmo seria apenas funcional, estrutural ou transportador de espécies ativas.<sup>77</sup> Outro ligante presente no arcabouço molecular são as tiossemicarbazonas, contendo o grupo tiofeno, a presença desse grupo permite variar diferentes substituintes, a fim de se compreender melhor a relação das mudanças estruturais com a atividade citotóxica.

A inserção de outros ligantes na esfera de coordenação como o cloreto disponibilizaria um sítio vacante de ligação, o qual poderia ser ocupado por um alvo biológico decorrente da ligação ao centro metálico, uma vez que o cloreto é um bom grupo abandonador e ao entrar na célula possivelmente sofreria hidrólise. Optou-se por um ligante mais lábil com a finalidade de evitar complexos inertes, já que os demais ligantes TSC e a trifenilfosfina, provavelmente não sairiam da esfera de coordenação.

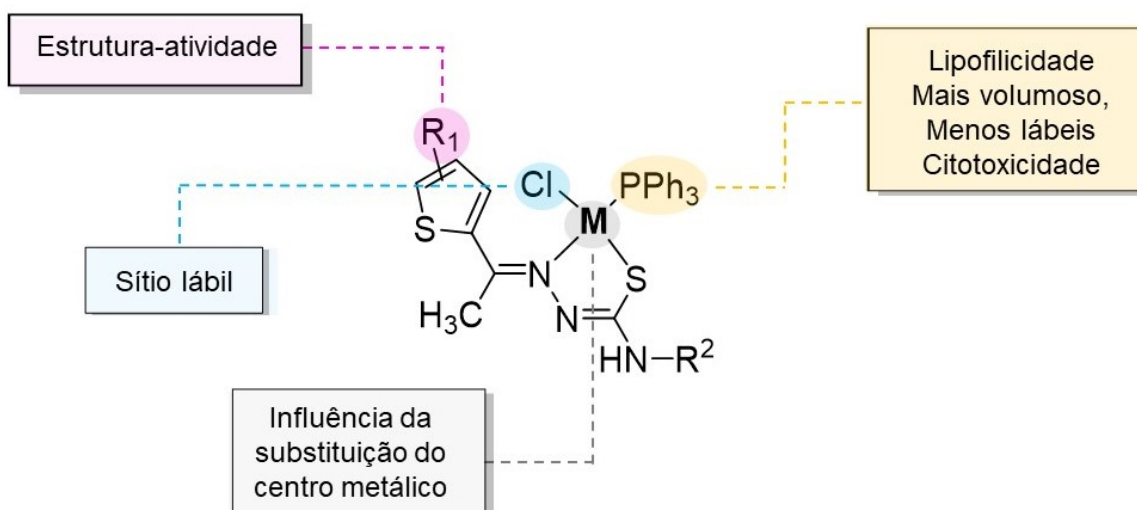


FIGURA 1.24 - Estrutura genérica dos compostos propostos. Fonte: autor.

## Capítulo 2 - OBJETIVOS

---

### 2.1 - Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal a síntese de complexos de Pd(II) e Pt(II) contendo ligantes derivados das tiossemicarbazonas e do heterociclo tiofeno, bem como o estudo da sua atividade citotóxica frente a células tumorais e não tumorais e a investigação da atuação biológica.

#### 2.1.1 - Objetivos específicos:

De forma a cumprir o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Síntese dos ligantes e seus complexos correspondentes de Pd(II) e Pt(II);
- Caracterização dos compostos pelas técnicas de Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) e Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis), bem como por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , DEPT-135, Espectrometria de Massas, Análise Elementar e quando possível por Difração de raios X por monocristal;
- Realização de estudos de estabilidade por UV-Vis e RMN de  $^{31}\text{P}$  em DMSO e na mistura DMSO/meio de cultura;
- Determinação do coeficiente de partição;
- Investigação da capacidade dos compostos em interagir com o DNA por meio de diferentes técnicas, tais como: Eletroforese em gel de agarose, Titulação espectroscópica por UV-Vis, Viscosidade, Dicroísmo Circular (DC), ensaio competitivo com Hoechst33258 e Docking Molecular;
- Verificação da inibição da atividade das enzimas Topoisomerases II $\alpha$ , II $\beta$  e I $\beta$  pela técnica de Eletroforese em gel de agarose;

- Determinação da concentração que inibe 50% da proliferação celular ( $IC_{50}$ ) para os compostos através de ensaios de citotoxicidade *in vitro* pelo método MTT frente a células tumorais de próstata (DU-145), de pulmão (A549), de mama (MDA-MB-231) e de ovário (A2780 Cis) e não tumoral de pulmão (MRC5);
- Avaliação da capacidade do complexo mais citotóxico em alterar a morfologia e migração celular, bem como analisar a influência no ciclo celular e no processo de apoptose.



## Capítulo 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 - Solventes e Reagentes

Os solventes acetonitrila (P.A. Synth) e metanol (P.A. Synth), bem como o reagente trifenilfosfina (99% Sigma-Aldrich) foram previamente purificados, conforme descrito na literatura.<sup>78</sup> Os demais reagentes usados nas sínteses foram utilizados sem purificação prévia e estão descritos na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 - Reagentes usados na síntese sem purificação prévia.

Reagente	Procedência
2-Acetyl-4-methylthiophene (97%)	Sigma-Aldrich
2-Acetyl-5-chlorothiophene (99%)	Sigma-Aldrich
2-Acetyl-5-bromothiophene (99%)	Sigma-Aldrich
2-Acetylthiophene (98%)	Sigma-Aldrich
4-Etil-3-tiossemicarbazida (97%)	Sigma-Aldrich
4-Metil-3-tiossemicarbazida (97%)	Sigma-Aldrich
Tiossemicarbazida (98%)	Sigma-Aldrich
Cloreto de Paládio (II) (99%)	Sigma-Aldrich
Tetracloroplatinato (II) de Potássio (98%)	Sigma-Aldrich
Ácido acético P.A.	Synth

### 3.2 - Síntese

#### 3.2.1 - Síntese dos Ligantes

A síntese dos ligantes foi realizada através de reações de condensação entre as tiossemicarbazidas e os tiofenos substituídos na razão estequiométrica 1:1, conforme representado na Figura 3.1. As sínteses se procederam de acordo com a metodologia descrita na literatura<sup>79</sup> e somente os ligantes BRET, MTET e MMT são inéditos. Primeiramente, foi adicionado o tiofeno correspondente (7 mmol) solubilizado em 10 mL de metanol seco e logo em seguida foi adicionado 1mL de ácido acético na solução. Posteriormente, ocorreu a adição das tiossemicarbazidas (7 mmol) com estequiometria 1:1 em relação ao tiofeno. Essas foram adicionadas na forma sólida na solução anterior. As reações foram mantidas em refluxo e agitação por 4h, sendo acompanhadas

por cromatografia em camada delgada (CCD). Após este período, as soluções foram rota-evaporadas e os sólidos resultantes foram purificados por meio de uma extração clorofórmio-água. Por último, as soluções em clorofórmio foram novamente rota-evaporadas e os sólidos foram secos a vácuo.

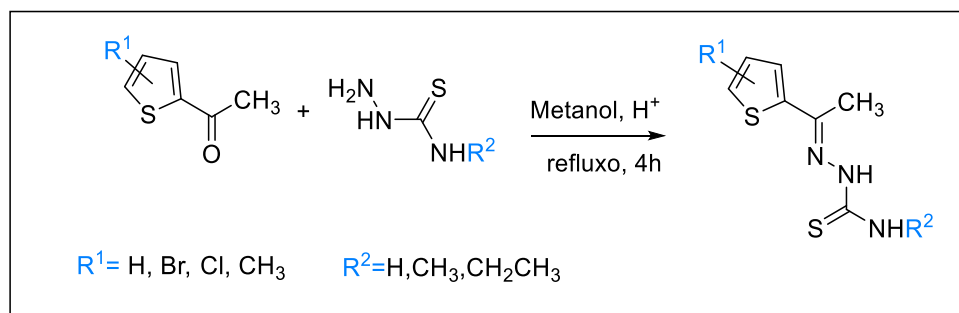


FIGURA 3.1 - Reação de condensação para obtenção dos ligantes.

### 3.2.2 - Síntese do precursor $[\text{PdCl}_2(\text{ACN})_2]$ :

A síntese do precursor metálico foi executada conforme citada na literatura.<sup>80</sup> A reação ocorre a partir da adição lenta de 0,5 g (2,82 mmol) de cloreto de paládio anidro ( $\text{PdCl}_2$ ) em um erlenmeyer de 200 mL contendo 20 mL de acetonitrila a 80°C. A suspensão foi mantida sob intensa agitação por 4h, e após esse período, observou-se a formação de um precipitado amarelo. O sólido resultante foi isolado a partir de uma filtração simples. Rend.: 73,25%

### 3.2.3 - Síntese dos complexos $[\text{MCl}(\text{L})\text{PPh}_3]$ :

O solvente acetonitrila foi desaerado no sonicador com o auxílio de uma bexiga com gás nitrogênio e o balão da reação era flambado com pistola enquanto um fluxo de gás nitrogênio passava pelo sistema de refluxo. Primeiramente, o solvente acetonitrila (15 mL) foi adicionado no balão, em seguida foi acrescentado o sólido correspondente aos ligantes (0,8 mmol) e por último, o precursor metálico  $[\text{PdCl}_2(\text{ACN})_2]$  (0,8 mmol) na razão estequiométrica 1:1.

A reação foi submetida a refluxo sob atmosfera inerte durante 24h, e após esse período, um equivalente da trifenilfosfina foi adicionada na solução, a qual foi mantida em refluxo por mais 24h.<sup>81</sup> Para as reações em que não se observava a formação de precipitados, as soluções eram mantidas na geladeira por dois dias para forçar a precipitação. Então, os sólidos obtidos eram isolados por filtração simples ou quando estes eram muito finos, eram secos em rota-evaporador, e posteriormente, recristalizados em acetonitrila. A evolução das reações foi acompanhada por CCD. Os análogos de platina foram obtidos de forma semelhante, porém usando como precursor metálico  $K_2[PtCl_4]$  e mistura de solvente  $H_2O/CH_3OH$  como demonstrado na Figura 3.2. Tanto os complexos de paládio quanto os de platina são inéditos.

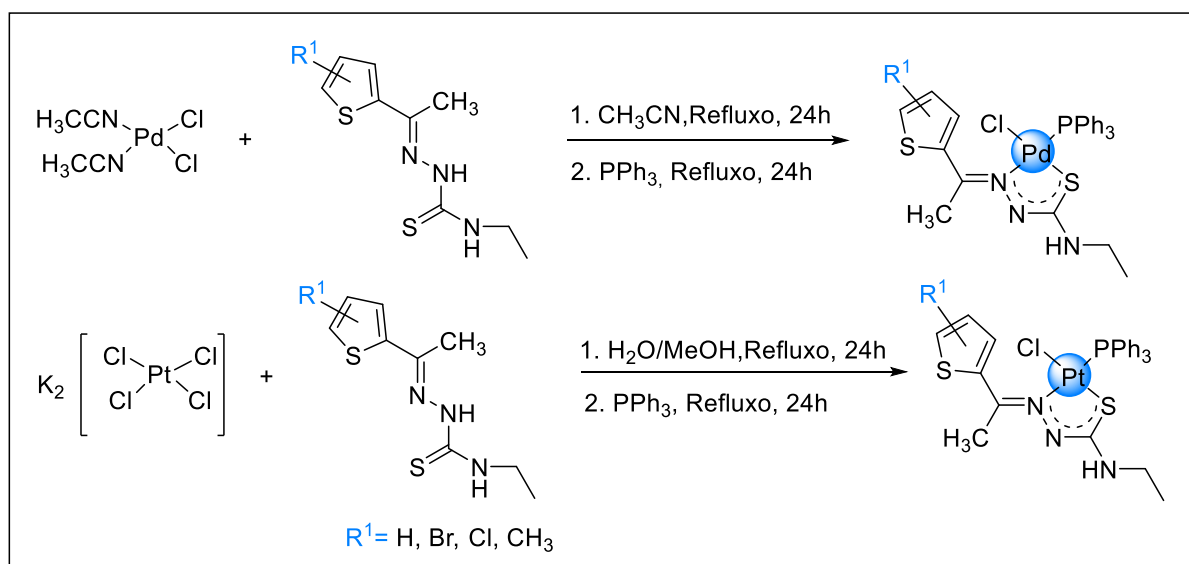


FIGURA 3.2 - Reação para obtenção dos complexos  $[MCl(L)PPh_3]$ .

### 3.2.4 - Síntese dos complexos $[M(DMSO)(L)PPh_3]$ :

A síntese dos complexos foi adaptada da literatura, na qual em uma solução laranja do complexo PdT ( $3,02 \times 10^{-5} M^{-1}$ ; 20 mg) em  $CH_2Cl_2$  (10 mL) foi adicionado  $AgNO_3$  ( $3,02 \times 10^{-5} M^{-1}$ ; 5,12 mg). A reação se procedeu no escuro durante 1h, sob agitação e a temperatura ambiente. Após a formação do precipitado  $AgCl$ , a solução foi centrifugada, o sobrenadante transferido para o balão de 25 mL, e o precipitado descartado. À solução resultante foi adicionado

DMSO ( $3,02 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ ; 2,14  $\mu\text{L}$ ), e esta foi submetida novamente a agitação constante a temperatura ambiente por 20h, conforme representado na Figura 3.3. Após o término da reação, não foi observado a formação de precipitado, sendo assim, o solvente foi reduzido com o auxílio do rota-evaporador e foi adicionado 4mL de hexano para forçar a precipitação do produto.<sup>82</sup>

A síntese do complexo de platina PtT foi realizada de forma semelhante ao complexo de paládio. Ocorreu a formação instantânea de um precipitado rosa, o qual foi lavado com hexano e filtrado a vácuo.



FIGURA 3.3 - Reação para obtenção dos complexos  $[M(X)(L)PPh_3]^+$ .

### 3.3 – Instrumentação:

#### 3.3.1 - Determinação do ponto de fusão:

As medidas de ponto de fusão foram obtidas em equipamento MARCONI NA 301, após a inserção da amostra macerada em capilar fechado, os sistemas foram aquecidos até a temperatura padrão estabelecida de 400 °C.

#### 3.3.2 - Análise Elementar:

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos complexos foram determinados por um analisador CHN modelo EA 1108 da FISONs, o qual pertence ao Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

### **3.3.3 - Condutividade Molar:**

As medidas de condutividade molar dos complexos foram realizadas em um condutivímetro Meter Lab., modelo CDM230 situado no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos inorgânicos (LERCI). As mesmas foram feitas a partir de soluções dos complexos em DMSO na concentração de  $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ .

### **3.3.4 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho:**

Os espectros na região do infravermelho foram registrados na região de  $4000\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$  com 64 varreduras, utilizando-se pastilhas na proporção 1:100 (m/m) de iodeto de cério (ICs) e composto, através de um espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100. O sal ICs foi mantido previamente na estufa à  $120^\circ\text{C}$  e os softwares utilizados na obtenção e interpretação dos espectros foram Shimadzu IRSolution, 1.60 e Origin 8.0.

### **3.3.5 - Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível:**

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC, utilizando soluções dos compostos em DMSO na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ . Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e a região de varredura correspondia a faixa entre 800 a 200 nm. Os softwares utilizados para obtenção e interpretação de espectros foram o UVProbe 2.21 e Origin 8.0.

### **3.3.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear:**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  (100 MHz) e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (162 MHz), COSY, HSQC, HMBC e DEPT-135 foram registrados a partir do equipamento BRUKER 9.4 T, modelo AVANCE III, situado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Para obtenção dos espectros utilizou-se o

solvente  $\text{CDCl}_3$ , enquanto para os ensaios de estabilidade  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  usou-se DMSO e capilar  $\text{D}_2\text{O}$  como referência externa.

### **3.3.7 - Estudo de estabilidade por RMN $^{31}\text{P}$ em DMSO e DMSO- $\text{D}_2\text{O}$ /DMEM:**

Os espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  foram registrados em diferentes períodos, a partir de uma solução dos compostos (10 mg) solubilizados em 600  $\mu\text{L}$  de DMSO- $d_6$ . No estudo com DMSO- $\text{D}_2\text{O}$ /DMEM, os compostos (5mg) foram solubilizados na mistura de DMSO (400  $\mu\text{L}$ ) e meio de cultura DMEM (100  $\mu\text{L}$ ). As soluções resultantes, foram transferidas para os tubos de RMN contendo os capilares com  $\text{D}_2\text{O}$ . Em ambos os estudos as leituras foram realizadas nos tempos de 0, 24 e 48h utilizando um espectrômetro BRUKER ARX 9,4T do Departamento de Química (DQ) da UFSCar.

### **3.3.8 - Estudos de estabilidade por UV-Vis:**

Os espectros das soluções de  $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  dos complexos foram registrados no espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC nos tempos de 0, 24 e 48h. Os ensaios foram realizados em DMSO com/sem luz e acetona.

### **3.3.9 - Estudo de estabilidade por Condutividade molar em DMSO:**

As soluções  $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  em DMSO foram preparadas e as medidas foram realizadas nos tempos de 0, 24 e 48h. As medidas foram realizadas usando um condutivímetro Meter Lab., modelo CDM230 situado no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos inorgânicos (LERCI).

## **3.4 - Difração de Raios X:**

Os cristais dos compostos aptos a análise de Difração de raios X de monocristal foram medidos pelo Dr. João Honorato de Araújo Neto em parceria com o Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química da USP de São Carlos. Para a coleta dos dados utilizou-se difratômetro do tipo automático Enraf-Nonius Kappa-CCD e Apex II Duo, ambos utilizando radiação da linha  $K\alpha$  do molibdênio (0,71070 Å). Usando Olex2, a

estrutura foi resolvida com o programa de solução de estrutura SHELXT, usando Fase Intrínseca e refinada com o pacote de refinamento SHELXL com minimização de Mínimos Quadrados. A investigação de possíveis interações intramoleculares e intermoleculares se procedeu com o auxílio de programas como Mercury 3.8 e Diamond 3.

### **3.5 – Espectrometria de Massas:**

Após da diluição da amostra na concentração de 500,0 ng.mL<sup>-1</sup> foi utilizado um Cromatógrafo à Líquido de Ultra Alta Eficiência para injeção em fluxo (FIA) e experimento All Ions com aumento da energia de colisão (0, 20 e 40 eV). Nesta análise foi empregada uma fase móvel de arraste que consistiu em H<sub>2</sub>O (solvente A) e ACN (solvente B) com ácido fórmico 0,1% (v/v). O fluxo foi de 0,400 mL.min<sup>-1</sup> com um volume de injeção de 10,0 µL. O íon molecular e os íons fragmentos foram simultaneamente obtidos pelo modo de aquisição MS2. Os espectros foram adquiridos monitorando uma faixa entre 100 e 1.500 Da e processados pelo software MassHunter Workstation Software versão B.08.00.

### **3.6 - Determinação da Lipofilicidade (logP)**

A determinação do coeficiente de partição foi realizada a partir da solubilização de 1 mg de composto em 300 µL de DMSO. Foram transferidos 30 µL da solução para um eppendorf e adicionou-se 750 uL de n-octanol, em seguida, homogeneizou-se a solução. Posteriormente, foi acrescentado 750 uL de água e as soluções resultantes foram mantidas sob agitação a 37 °C por 24h.<sup>83</sup> As medidas de absorvância dos complexos em n-octanol/água foram realizadas em triplicata no espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC. Considerando a absorvância média obtida, o valor da concentração dos complexos em n-octanol e água, foram determinados a partir da curva padrão previamente obtida. A curva padrão foi proveniente da obtenção de espectros após oito adições sucessivas de 50 µL da solução do complexo em n-octanol em uma cubeta contendo 2500 µL contendo n-octanol. A medida de lipofilicidade adotada é o log P, que é da fração entre a

concentração de composto em n-octanol e em água, conforme representado pela equação abaixo:<sup>84</sup>

$$\log P = [\text{Composto}]_{\text{n-Oct}}/[\text{Composto}]_{\text{água}}$$

### **3.7 - Estudo de Interação com Biomoléculas**

#### **3.7.1 - Estudo de Interação com DNA: Ultravioleta-visível**

Inicialmente, preparou-se uma solução  $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  de ct-DNA, a qual foi mantida em geladeira por 24h. Após este período, verificou-se a razão entre as absorvâncias entre A260/A280, o valor de 1,8, indica um ct-DNA próprio para uso, uma vez que se encontra livre de contaminação por proteína, conforme relatado na literatura.<sup>43</sup> O ensaio para investigação de interação dos compostos com o DNA por UV-Vis consistiu na preparação de uma solução de complexo (40  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris.HCl em cubeta de quartzo (3mL). Em seguida, foram adicionadas sucessivas adições contendo 6  $\mu\text{L}$  da solução de DNA (2,5 mM) nas cubetas tanto da amostra (2880  $\mu\text{L}$  de tampão e 120  $\mu\text{L}$  de complexo) quanto do branco (2880  $\mu\text{L}$  de tampão e 120  $\mu\text{L}$  de DMSO). Posteriormente, os espectros correspondentes foram registrados. A constante de ligação dos complexos com ct-DNA foi determinada aplicando-se a equação de Benesi–Hildebrand:<sup>85</sup>

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) = [\text{DNA}]/(\epsilon_B - \epsilon_F) + 1/K_b (\epsilon_B - \epsilon_F)$$

Onde,  $K_b$  é a constante de ligação;  $\epsilon_f$  é o coeficiente de absorvidade molar do complexo;  $\epsilon_a$  é o coeficiente de absorvidade molar aparente, que corresponde à razão entre a absorvância medida e a concentração do complexo ( $A_{\text{obs}}/[\text{Complexo}]$ ). A constante de ligação é obtida através da razão entre o coeficiente angular da reta e o coeficiente linear do gráfico:  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  vs.  $[\text{DNA}]$ .

#### **3.7.2 - Estudo de Interação com DNA: Eletroforese em Gel**

Os complexos, solubilizados em DMSO, foram incubados em diferentes concentrações (0,1-100  $\mu\text{M}$ ) com o DNA plasmidial (pBR322) por 24h



a 37°C. O controle positivo (C+) era composto pela cisplatina (10 µM) e DNA (1 µM) e o controle negativo (C-) consistia somente no DNA (1 µM), sendo que para se alcançar o volume final de 20 µL, a solução era completada com água Milli-Q. Após o término da incubação, foi adicionado 15 µL de STEB (40% de sacarose, 100 mM de Tris.HCl, pH = 7,4, 1 mM de EDTA, 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de azul de bromofenol) às amostras. Em seguida, foram transferidos 20 µL das amostras para os poços no gel de agarose (1%) em tampão TBE (1X), o qual foi submetido a uma corrente de 20 mA por 5h. Após o término da corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio por 5 min e a sua revelação foi realizada no fotodocumentador Gel Doc™ EZ, a imagem obtida foi tratada utilizando o software ImageLab™ 6.0.0 fornecido pela BioRad.

### 3.7.3 - Dicroísmo Circular

Os experimentos de Dicroísmo Circular foram realizados pelo MSc. Renan Diego Zanetti no Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica do Instituto de Química - UNESP Araraquara. Espectros de CD foram obtidos para amostras de DNA na presença de quantidades crescentes dos complexos PdT e PdCl. As medidas foram registradas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO, utilizando cubeta de quartzo de 3 mL, na faixa 235 a 320 nm, com acumulação de 5 scans, largura de banda de 1,0 nm, velocidade de 100 nm/min e temperatura de 25 °C. A concentração de DNA foi mantida fixa em 5x10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup> enquanto a concentração dos complexos foi variada de 0 a 2x10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup> (razão complexo/DNA de 0 a 0,4).

Inicialmente, foram preparados 40 mL de uma solução de DNA 5x10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup> em tampão tris-HCl (pH 7,2), os quais foram distribuídos igualmente em dez tubos de ensaio. Adições crescentes do complexo de interesse foram feitas a cada tubo, partindo-se de uma solução fresca de concentração 1x10<sup>-3</sup> M<sup>-1</sup> em DMSO, mantendo a concentração do solvente orgânico abaixo de 2%. As

amostras foram incubadas a 37 °C por 24h e após o período as leituras foram realizadas.<sup>86,87</sup>

### **3.7.4 - Estudo de Interação com DNA-Viscosidade**

As medidas de viscosidade foram realizadas utilizando um viscosímetro de Oswald em um banho com temperatura de 25°C, empregando um cronômetro para a medida do tempo de escoamento. Foram utilizadas diferentes relações DNA/complexo em DMSO (10%), e os resultados foram expressos a partir de um gráfico  $(\eta/\eta^0)^{1/3}$  versus  $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$ , em que  $\eta$  é a viscosidade relativa do ct-DNA na presença do complexo e  $\eta^0$  na ausência do complexo.

### **3.7.5 - Ensaio de Fluorescência com Hoechst 33258**

O corante Hoechst 33258 tem a capacidade de interagir com o DNA gerando um aduto com propriedades fluorescentes. O ensaio de supressão de fluorescência consiste na competição entre os complexos de estudo e o corante pelo sítio ativo dessa interação. Caso os compostos apresentem a capacidade de suprimir a intensidade de fluorescência do aduto DNA-corante, entende-se que a molécula de interesse possui afinidade significativa com este sítio ativo, demonstrando uma via de interação complexo-DNA.

Inicialmente, foram preparados 70 mL de solução de DNA  $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  em tampão tris-HCl (5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl em pH 7,3) contendo 420  $\mu\text{L}$  de Hoechst 33258 a  $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ . Tal solução foi igualmente distribuída em 20 tubos de ensaio. Adições crescentes dos compostos foram feitas, partindo-se de uma solução fresca de concentração  $2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  em DMSO, sendo a quantidade de solvente orgânico adicionado aos tubos igual ou inferior a 3% (Tabela 3.2). Um período de repouso de 5 min foi mantido em cada adição antes da realização da leitura de fluorescência. As leituras foram realizadas em cubeta de quartzo com excitação em 350 nm, em uma faixa de 358 a 660 nm, com acumulação de 1 scan a temperatura de 25 °C. A concentração de DNA foi mantida fixa em  $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$

e do Hoechst em  $6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ . A concentração dos complexos variou-se de 0 até  $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

TABELA 3.2 - Relação de volumes de DNA+Hoechst e complexo (Cx) utilizados na preparação dos tubos de ensaio.

Tubos	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)	i)	j)
DNA+Hoechst/ mL	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
[Cx]/ $\mu\text{L}$	10	18	27	36	45	54	63	72	81	90

A fim de determinar quantitativamente a magnitude de interação entre os complexos e o DNA, a equação de Stern-Volmer foi usada:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

Onde  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência do aduto Hoechst-DNA antes e após a adição dos complexos, respectivamente. A constante  $K_{sv}$  é a constante de extinção de Stern-Volmer e  $[Q]$  é a concentração do complexo em questão estudado.<sup>88,89</sup>

### 3.8 - Ancoragem molecular

Visando uma maior compreensão do sistema, estudos de ancoragem molecular dos tipos de interações DNA-Complexos foram realizados. Para a minimização energética das estruturas dos complexos metálicos, se aplicou o hamiltoniano PM7 (método paramétrico 7) com o *software* MOPAC.<sup>90</sup> Os desvios médios quadráticos (RMSD) de 0,2219 Å e 0,483848 Å, indicaram que as sobreposições dos átomos pesados para as estruturas cristalográficas e teóricas são convergentes para os complexos PdCH<sub>3</sub> e PdBr, respectivamente, Figura 3.4. É importante salientar que, os valores de RMSD inferiores a 2,0 Å são considerados adequados.<sup>91,92</sup>

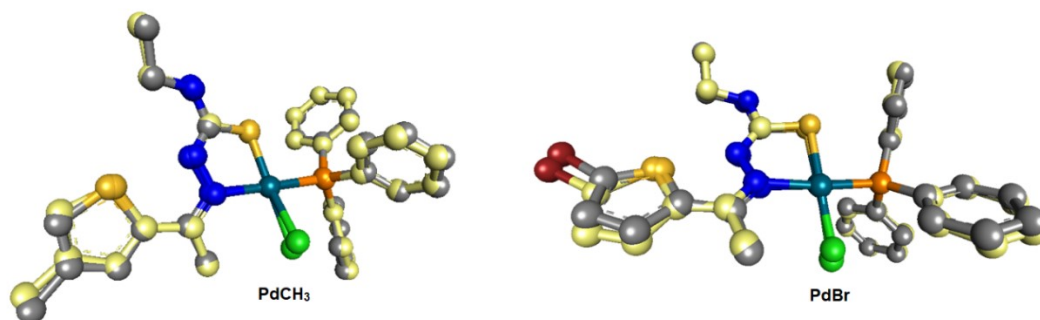


FIGURA 3.4 - Sobreposição entre as estruturas minimizadas (átomos de C em bege) e experimental (átomos de C em cinza), dos complexos PdCH<sub>3</sub> e PdBr. Os valores de RMSD = 0,2219 Å e 0,4424 Å aprovam o protocolo de modelagem molecular implementado.

O arquivo contendo as coordenadas cartesianas 3D da biomacromolécula (PDB ID 1BNA) foi extraído do banco de dados de proteínas (PDB, *Protein Data Center*).<sup>93</sup> A estrutura se organiza como duplas fitas de DNA na forma B, cuja a sequência consiste em 5'-D(CGCGAATTCGCG)-3', sendo resolvida por difração de raios X e resolução de 1,79 Å. Utilizando o AutoDockTools-1.5.7, o arquivo \*.pdb da biomacromolécula foi utilizado como *input*, sendo extraídas todas as águas co-cristalizadas.<sup>94</sup> Em sequência, todos os átomos de hidrogênio foram adicionados e computadas as cargas de Kollman. Finalmente, a estrutura da biomacromolécula foi salva no formato \*.pdbqt. Por sua vez, os complexos metálicos foram carregados no formato \*.mol2, computadas as cargas de Gasteiger e mantidas livres todas as ligações rotacionáveis. Os arquivos foram salvos em formato \*.pdbqt. Utilizando o *software* Autogrid4, a *grid box* foi centrada no ponto  $x, y, z$  (14,780 20,976, 8,807) com dimensões de caixa 40, 40, 96 ngpts e espaçamento 0,375 Å, contemplando toda estrutura do ácido nucleico, mapeando-se as energias de interação para todos os átomos do sistema em análise. É importante ressaltar que nessa etapa os parâmetros de campo de força para os centros metálicos de Pd(II) e Pt(II) foram adicionados ao arquivo “AD4\_bound.dat”. Finalmente, o arquivo gerado foi salvo na extensão \*.gpf. As simulações de ancoragem molecular foram conduzidas através do

*software* autodock4, modo semiflexível, aplicando-se o algoritmo de busca genético (Lamarckian GA), cujas condições seguem: 150 indivíduos por população; 2500000 avaliações energéticas; 27000 gerações; limite de 1 indivíduo sobrevivente para próxima geração; taxa de mutação de gene 0,02; taxa de “*crossover*” 0,8; número de corridas 100. Por fim, os complexos de interação melhores pontuados foram exportados como \*.pdb e analisados com o *software* Biovia Discovery Studio Visualizer.<sup>95</sup>

### **3.9 - Estudo de interação com a Topoisomerase I e II: Eletroforese em gel**

O ensaio de inibição da enzima DNA-Topoisomerase II $\alpha$  foi realizado com o kit de relaxação do DNA fornecido pela Inspiralis Limited. No ensaio foi usado 1  $\mu$ L de DNA (pBR322), 3  $\mu$ L de tampão (Tris.HCl 4,5 mM, 0,5 mM de Tris. base e 50 mM de NaCl com pH 7,4) e 1  $\mu$ L (1,0 mM) de ATP para a preparação do mix. A solução de ensaio era composta por 4,5  $\mu$ L de mix, 23  $\mu$ L de água, 1,5  $\mu$ L dos complexos e, por fim, 1  $\mu$ L da topo II. Os complexos foram testados em diferentes concentrações (0,1 1,00; 10,0;100  $\mu$ M). Para a realização do ensaio, as amostras foram mantidas incubadas a 37 °C por 45 minutos. Após este período foram adicionados 3  $\mu$ L de SDS (dodecil sulfato de sódio) e realizado um choque térmico a 60 °C por 2 minutos para interromper o processo enzimático. Após a interrupção da ação enzimática foram adicionados 15  $\mu$ L de STEB (40% de sacarose, 100 mM de Tris.HCl, pH = 7,4, 1 mM de EDTA, 0,5 mgmL<sup>-1</sup> de azul de bromofenol) e 60  $\mu$ L de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, a partir do sobrenadante, 20  $\mu$ L da fase aquosa foram adicionados no gel de agarose 1%, em solução tampão de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) pH = 8,2. A corrida eletroforética se procedeu em 20 mA por 5h. A revelação do gel e o tratamento das imagens foram realizados da mesma forma descrita no item anterior. O ensaio eletroforético com a enzima Topoisomerase I segue o mesmo protocolo descrito para Topoisomerase II, sem adição de ATP ao mix.

### 3.10 - Ensaios Celulares

A avaliação da atividade citotóxica para os complexos foi realizada frente as linhagens celulares tumorais humanas de mama triplo negativo MDA-MB-231 (ATCC No. HTB-26), pulmão A549 (ATCC No. CCL-185), próstata DU-145 (ATCC No. HTB-81), ovário A2780 Cis (ECACC No. 93112517) e não tumoral humana de pulmão MRC-5 (ATCC N. CCL-171). As linhagens MDA-MB-231, A549 e MRC5 foram cultivadas utilizando-se o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Vitrocell), suplementado com 10% de FBS, enquanto as linhagens DU-145 e A2780 Cis foram mantidas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*; Vitrocell), também contendo 10% de soro fetal bovino. Para o cultivo celular, as mesmas foram submetidas a estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C.

#### 3.10.1 - Ensaio de Viabilidade Celular

A determinação da citotoxicidade dos compostos foi realizada utilizando-se o método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium). Para a realização do ensaio, as células foram semeadas em uma placa de 96 poços (1,5x10<sup>4</sup> células (150 µL/poço) e incubadas por 24 horas à 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adesão celular. Posteriormente, foram adicionadas diferentes concentrações dos complexos em DMSO, de maneira que a porcentagem final de DMSO utilizada seja de no máximo 0,5%. A placa foi mantida em estufa (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) por mais 48 horas. Após o tempo de incubação, foram adicionados 50 µL de MTT (1mg/mL) por poço, em seguida, incubou-se novamente em estufa (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) por 3 horas. Depois, retirou-se o sobrenadante e solubilizou-se os cristais de formazan em 150 µL de isopropanol. Por último, foi realizada a leitura das placas em 540 nm com o auxílio do leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo SYNERGY H1. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados utilizando-se o *software* GraphPad Prism.

### 3.10.2 - Ensaio de Wound Healing

A capacidade dos complexos mais promissores em influenciar na migração celular foi avaliada em células das linhagens tumorais A549 e A2780 Cis utilizando-se o ensaio de *Wound Healing*. Foram plaqueadas  $1,5 \times 10^5$  células/poço em placas de 12 poços, em seguida, foram incubadas em estufa por 24 horas, a fim de se adquirir uma confluência celular próxima de 100%. Com o auxílio de uma ponteira de 1 mL realizou-se uma risca na monocamada de células aderidas aos poços. O meio de cultura foi removido, os poços foram cuidadosamente lavados com PBS e um novo meio contendo os complexos em diferentes concentrações ( $\frac{1}{8} \times IC_{50}$ ,  $\frac{1}{4} \times IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ) foi adicionado. As imagens foram registradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas utilizando microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS100) acoplado a uma câmera Motcam 1SP 1.3 MP. Os dados de porcentagem de inibição foram analisados no *software* Image J.

### 3.10.3 - Ensaio de Morfologia Celular

Os compostos mais citotóxicos nas linhagens celulares tumorais A549 e A2780 Cis foram investigados em relação a sua capacidade de provocar alterações morfológicas nas células. Para a realização dos ensaios de morfologia celular foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células/poço na A549 e  $0,5 \times 10^5$  células/poço na A2780 Cis em placas de 12 e 24 poços, respectivamente. Em seguida, as placas foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o período de incubação, os complexos em diferentes concentrações ( $\frac{1}{4} \times IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $2 \times IC_{50}$ ,  $4 \times IC_{50}$ ) foram adicionados e fotos foram registradas em diferentes intervalos de tempo (0h, 24h e 48h), utilizando-se um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS100) acoplado a uma câmera Motcam 1SP 1.3 MP.

### 3.10.4 – Ensaio Clonogênico

As células A780 Cis (300 células/poço) foram semeadas em uma placa de 6 poços e mantidas em um meio suplementado em 37 ° C em 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos (0,035 µM, 0,07 µM, 0,14 µM, 0,28 µM, 0,56 µM) e incubadas por 48 h. No controle, foi adicionado apenas DMSO (0,5%) nas mesmas condições. Após esse período, o meio foi substituído por um meio fresco sem qualquer complexo, e as placas foram incubadas por 10 dias. As células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e ácido acético (3: 1) por 5 min, e coradas com 5% de cristal violeta por 30 min. O número de colônias formadas foi analisado usando o software ImageJ.

### 3.10.5 - Análise do ciclo celular

A quantificação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular pode ser realizada por citometria de fluxo através da marcação com iodeto de propídeo. As células A2780 Cis foram plaqueadas ( $2,0 \times 10^5$  células/poço) em placa de 12 poços e mantidas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas em estufa úmida de cultura de células. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo (0,14 µM, 0,28 µM, 0,56 µM), no controle negativo foi adicionado 0,5% de DMSO. Após o tempo de exposição dos complexos com as células por 48h, os compostos foram removidos das placas, lavado com PBS e centrifugada a 1000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular foi incubado com 500 µL de álcool etílico gelado (70 %), por 24h, a -20°C. Logo em seguida, as células foram lavadas com PBS e centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em ribonuclease (RNase A) 0,2 mg/mL e PI (iodeto de propídeo), incubados por 30 minutos. A análise da porcentagem das células em cada fase do ciclo foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences).<sup>96,97</sup>



## Capítulo 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 - Síntese e caracterização dos compostos

Os complexos foram obtidos conforme adaptação da metodologia sintética descrita por Oliveira e colaboradores, a qual é constituída por duas etapas, quando a primeira consiste na reação entre os ligantes e o precursor metálico *bis*(acetonitrila)dicloridopaládio(II),  $[\text{PdCl}_2(\text{ACN})_2]$ .<sup>49</sup> Essa fornece a formação de um intermediário binuclear *in situ* contendo os ligantes cloretos em ponte entre os centros metálicos e o mesmo é proveniente da substituição dos ligantes acetonitrilas pelos ligantes derivados das tiossemicarbazonas, o que confere uma maior estabilidade ao sistema devido ao efeito quelato. Além do intermediário binuclear, provavelmente ocorre a formação de um complexo mononuclear de Pd(II) contendo dois ligantes clorido.

De acordo com a literatura, ocorre primeiramente a saída dos ligantes acetonitrilas, pois os nitrogênios são bases duras de Pearson e portanto se ligam mais fracamente com os metais Pd(II) e Pt(II), os quais são ácidos moles. Além dos átomos de cloro serem um pouco mais moles do que o nitrogênio e conseqüentemente exibem uma afinidade maior pelos centros metálicos, estes também apresentam orbitais d disponíveis que são capazes de estabilizar de forma mais efetiva os orbitais do metal. Posteriormente, um equivalente de trifenilfosfina é adicionado promovendo a clivagem da ligação Pd-Cl e originando os produtos de interesse como demonstrado na Figura 4.1.

A coordenação da trifenilfosfina ao centro metálico normalmente ocorre *trans* ao N íminico (C=N) e não ao átomo de enxofre, evitando a desestabilização da ligação M-L por uma competição pela densidade eletrônica do orbital d do metal para os orbitais d dos átomos de P e S, o que enfraqueceria ambas as ligações Pd-S e Pd-P.<sup>81</sup> As reações foram submetidas a refluxo e acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), na qual foi verificado a formação de um único produto em 48h. Em um tempo menor era

possível observar a presença de subprodutos, os quais também foram constatados por Ressonância Magnética Nuclear de  $^{31}\text{P}$ .

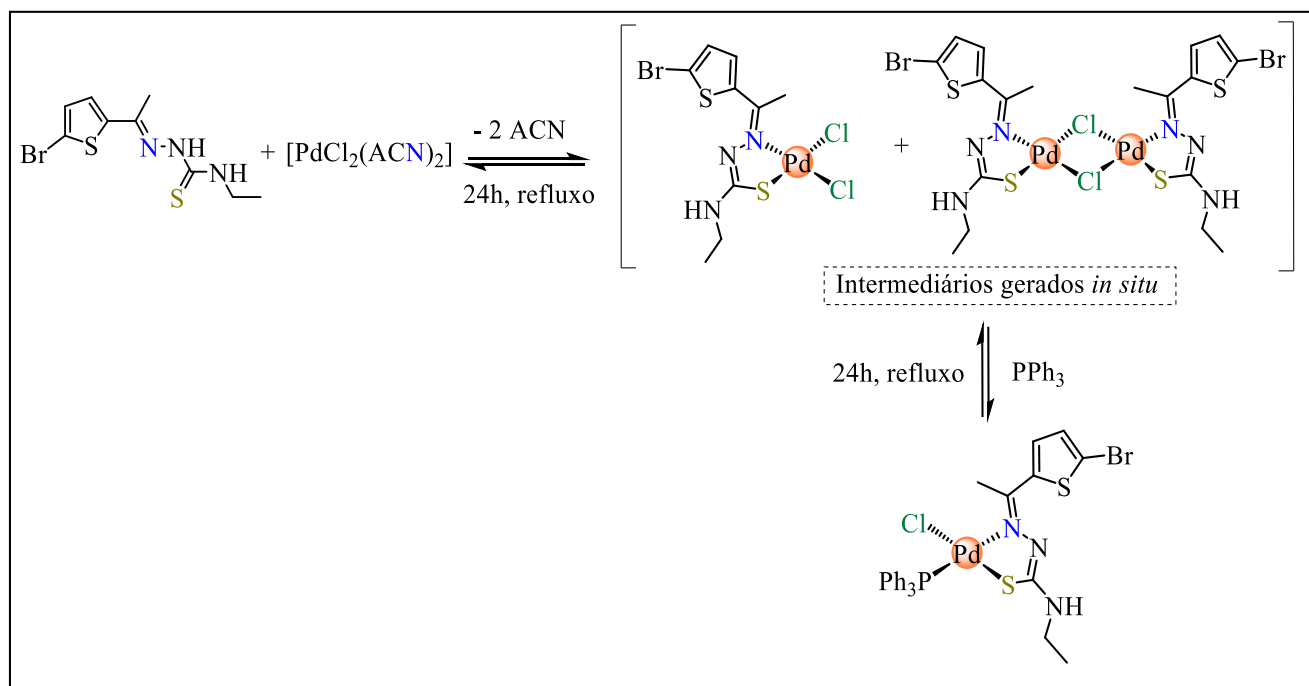


FIGURA 4.1 - Proposta de mecanismo para obtenção dos complexos.

Os dados provenientes da Análise Elementar tanto para os ligantes quanto para os complexos demonstraram que os valores teóricos, descritos entre parênteses, estão próximos aos valores experimentais, os quais estão de acordo com as estruturas propostas, conforme demonstra na Tabela 4.1.

Os resultados da Condutividade molar em DMSO também foram relatados na tabela 4.1 e a partir destes verificou-se que os compostos de paládio e o composto de platina  $\text{PtBr}$  em DMSO apresentaram valores de condutividade molar na faixa entre  $0,985$  e  $4,5 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ , de acordo com a sua natureza não eletrolítica, sugerindo a coordenação do ligante na sua forma aniônica. Esse comportamento também foi descrito por Nyawade e colaboradores em 2021 para compostos semelhantes, uma indicação de que o íon cloreto está dentro da esfera de coordenação.<sup>40</sup>

TABELA 4.1 - Caracterizações e análise elementar dos compostos.

Composto	P.F	Cor	Rendimento	Condutividade (S cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> )	Análise Elementar		
					C%	H%	N%
C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> BrN <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	172-174°	Amarelo	92,34%	-	35.79 (35.30)*	3.96 (3.95)	13.95 (13.72)
C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	144-147°	Amarelo	87,35%	-	41.09 (41.29)	4.79 (4.62)	16.04 (16.05)
C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	145-148°	Amarelo	75,89%	-	49.15 (49.76)	5.83 (6.26)	17.65 (17.41)
C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	114-117°	Amarelo	84,03%	-	47.98 (47.55)	5.38 (5.76)	18.83 (18.48)
C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	185-186°	Amarelo	89,09%	-	38.78 (38.78)	4.07 (4.07)	16.96 (16.96)
C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	205-208°	Amarelo	95,07%	-	32.88 (32.88)	3.45 (3.45)	14.38 (14.38)
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	124-126°	Amarelo	78,11%	-	45.04 (45.04)	5.20 (5.20)	19.70 (19.70)
C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> BrClN <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	221-224°	Laranja	71,61%	2,63	46.38 (45.71)	3.68 (3.69)	6.37 (5.92)
C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	201-204°	Laranja	52,39%	1,07	49.18 (48.77)	3.96 (3.94)	6.98 (6.32)
C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	180-183°	Laranja	62,78%	0,98	52.84 (52.18)	4.47 (4.54)	6.74 (6.52)
C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> ClN <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	226-229°	Laranja	72,51%	4,54	51.74 (51.44)	4.17 (4.32)	7.02 (6.66)
C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> BrClN <sub>3</sub> PPtS <sub>2</sub>	219-222° (decompõe)	Rosa	71,26%	1,11	41.07 (40.64)	3.46 (3.28)	5.08 (5.27)
[C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>3</sub> PPtS <sub>2</sub> ]Cl	203-207°	Laranja	57,64%	46,41	45,03 (44,97)	3,92 (4,05)	5,83 (5,83)

\*Valores teóricos (entre parênteses)

Porém, o composto PtT exibiu condutividade molar de 46,41 Ω<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> indicando uma natureza iônica 1:1, sugerindo que não houve desprotonação do ligante, estando coordenado ao centro metálico na sua forma neutra. Esse valor está de acordo com a literatura, uma vez que eletrólitos 1:1 encontram-se na faixa entre 20-62 Ω<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>.<sup>98</sup>

## 4.2 - Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

### (FTIR):

De acordo com a literatura as tiossemicarbazonas podem exibir tautomerismo de tiona-tiol em solução decorrente da função tioamida (NH-C=S). Portanto, verificou-se que os ligantes em estudo não exibiram a presença de banda na região entre 2500-2600  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento SH. Além disso, também foi observado a presença das bandas referentes aos estiramentos NH e C=S nos espectros dos ligantes sugerindo que as tiossemicarbazonas permanecem na sua forma tiona no estado sólido.<sup>99</sup>

Os compostos derivados de tiossemicarbazonas podem interagir com os metais de diferentes maneiras, porém a coordenação destes, de forma geral, ocorre via átomos de N e S fornecendo ligantes bidentados aniônicos.<sup>26</sup> Esse modo de coordenação é observado para os complexos de paládio de interesse, o qual é evidenciado pela ausência da banda em torno de 3200  $\text{cm}^{-1}$  nos seus respectivos espectros, referente ao estiramento N-H, indicando a desprotonação do ligante e coordenação aniônica.

De acordo com a literatura, bandas fortes e largas entre 3445-3257  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento  $\nu(\text{N—H})$  tioamídico, e as bandas entre 3167–3109  $\text{cm}^{-1}$  estão associadas ao estiramento assimétrico  $\nu(\text{N—H})$  hidrazínico.<sup>100</sup> Tal comportamento é exemplificado na Figura 4.2 (a), a partir da sobreposição dos espectros do ligante TET e os seus respectivos complexos PdT e PtT. É possível observar que para o complexo de paládio ocorre o desaparecimento da banda N-H em 3203  $\text{cm}^{-1}$ , no entanto, o mesmo não é notado para o composto de platina. Essa observação está condizente com os dados de condutividade molar, os quais evidenciaram a natureza não eletrolítica do PdT e a presença do PtT como eletrólito 1:1. Porém, a presença de uma banda alargada na região entre 2373-3207  $\text{cm}^{-1}$  no espectro do complexo PtT, característica de ligações OH decorrentes da presença de água no composto que proporcionam a formação de interações de

hidrogênio, dificultou a visualização da presença da banda NH. Todavia, a presença deste grupo foi comprovada por RMN.

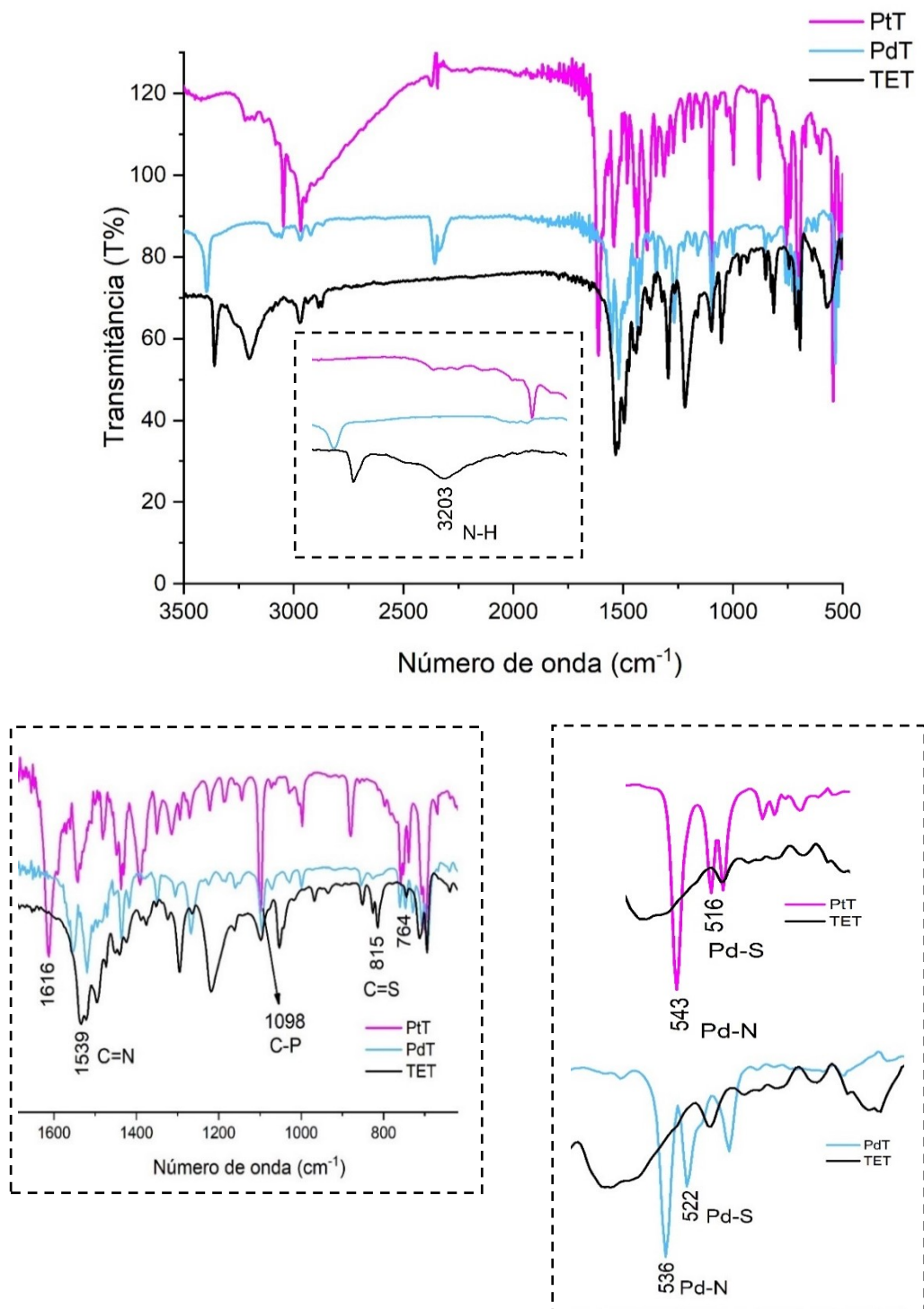


FIGURA 4.2 - Sobreposição dos espectros de FTIR para o ligante TET (preto) e os complexos PdT (azul) e PtT (rosa): (a) espectro geral e ampliação da região NH, (b) ampliação da região dos estiramentos C=N e C=S e (c) ampliação da região das bandas Pd-N e Pd-S.

A atribuição dos estiramentos permitiu inferir os deslocamentos em relação as principais bandas diagnósticas de coordenação como a C=N e C=S. Desse modo, foi possível sugerir o deslocamento do estiramento C=S que provavelmente ocorre em  $815\text{ cm}^{-1}$ , região na qual também pode haver contribuição do estiramento C-S do tiofeno o que dificulta a atribuição dos mesmos, no ligante para região de  $754\text{-}760\text{ cm}^{-1}$  nos complexos, o que caracteriza um deslocamento para uma região menos energética.<sup>40,59</sup> Tal deslocamento indica que ocorreu uma doação de densidade eletrônica do enxofre da tiossemicarbazona para o metal e como a coordenação provoca a desprotonação do ligante, o que gera uma deslocalização da densidade eletrônica enfraquecendo a ligação C=S, uma vez que ocorre uma diminuição do caráter  $\pi$  desta ligação e conseqüentemente aumenta a densidade eletrônica da ligação C-N. Esse comportamento é evidenciado pelo deslocamento significativo do estiramento C-N para uma região mais energética dos espectros PdT e PtT, os quais deslocaram de  $1294$  para  $1311\text{ cm}^{-1}$  e  $1319\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.<sup>40</sup>

O estiramento C=N é atribuído a uma banda com intensidade acentuada na região de  $1539\text{ cm}^{-1}$  no espectro do ligante livre. Esta banda encontra-se na região de  $1557\text{ cm}^{-1}$  no espectro do complexo PdT e em  $1616\text{ cm}^{-1}$  no PtT.<sup>40</sup> Esse deslocamento foi mais pronunciado no complexo de platina, apresentando um deslocamento de aproximadamente  $77\text{ cm}^{-1}$ . No entanto, em ambos os complexos, o deslocamento do estiramento C=N foi significativo, indicando que a coordenação ao centro metálico ocorreu via átomo de N imínico. Além disso, a mudança para números de onda mais elevados da banda (NN), observada para os complexos de platina e paládio, também foi relacionada à deslocalização eletrônica, ocorreu como consequência da coordenação através do átomo de nitrogênio azometino e desprotonação de tiossemicarbazonas.<sup>40</sup>

A coordenação via átomos de N e S ainda é reforçada pelo surgimento de duas bandas na região de  $536\text{ cm}^{-1}$  e  $522\text{ cm}^{-1}$ , as quais estão relacionadas a presença dos estiramentos Pd-N e Pd-S, respectivamente. Já no

complexo de platina o estiramento Pt-N é atribuído a banda em  $543\text{ cm}^{-1}$ , enquanto o estiramento Pt-S corresponde a banda em  $516\text{ cm}^{-1}$ . A partir das modificações dos estiramentos foi possível concluir que todos os ligantes se coordenam aos centros metálicos como N,S-bidentados. As bandas próximas as regiões de  $340\text{ cm}^{-1}$  presentes nos espectros dos complexos foram atribuídas aos estiramentos M-Cl, conforme descrito na literatura.<sup>101</sup> A presença do ligante trifenilfosfina é confirmado nos espectros de todos os complexos pelo surgimento de uma banda em torno de  $1096\text{ cm}^{-1}$ . A mesma está coerente com o valor de  $1097\text{ cm}^{-1}$  descrito na literatura para o estiramento P – C em complexos de paládio.<sup>102,103</sup> As atribuições para os principais modos vibracionais encontram-se descritas na Tabela 4.2. De forma geral, os compostos apresentam grande similaridade estrutural e por isso apenas o ligante TET e seus respectivos complexos foram selecionados para uma discussão mais detalhada, assim os espectros referentes aos demais compostos encontram-se nos anexos.

TABELA 4.2 - Atribuição dos estiramentos dos compostos por IV.

Compostos	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	N-H	N-N	C-N	M-Cl	M-S	M-N	PPh <sub>3</sub>
CLET	1536 (F)	812 (F)	3106 (f)	1085 (m)	1309 (m)	-	-	-	-
BRET	1536 (F)	808 (m)	3105 (f)	1083 (m)	1307 (m)	-	-	-	-
TET	1539 (F)	815 (F)	3203 (m)	1100 (m)	1294 (m)	-	-	-	-
MET	1526 (F)	810 (F)	3209 (m)	1086 (m)	1297 (m)	-	-	-	-
PdBr	1554 (F)	746 (m)	-	1071 (f)	1318 (m)	344 (f)	510 (m)	534 (F)	1098 (F)
PdCl	1562 (F)	745 (m)	-	1073 (f)	1322(m)	339 (f)	513 (m)	534 (F)	1097 (F)
PdT	1557 (F)	764 (m)	-	1076 (f)	1311 (f)	338 (f)	522 (m)	536 (F)	1096 (F)
PdCH <sub>3</sub>	1570 (F)	750 (m)	-	1076 (f)	1307 (f)	334 (f)	509 (m)	532 (F)	1102 (F)
PtBr	1505 (F)	758 (m)	-	1028 (f)	1394 (f)	340 (f)	517 (m)	546 (F)	1103 (F)
PtT	1605 (F)	757 (F)	3203 (f)	998 (m)	1319 (f)	344 (f)	516 (m)	545 (F)	1089 (F)

### 4.3 - Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível:

Os espectros eletrônicos do ligante e dos complexos foram realizados em DMSO na concentração de  $1 \times 10^{-5}\text{ M}^{-1}$ . Na Figura 4.3 está representada a sobreposição dos espectros referentes aos ligantes e seus respectivos complexos de paládio e platina. Nos espectros dos ligantes foi observada uma banda intraligante próxima a 270 nm correspondente as transições eletrônicas do tipo n

→  $\pi^*$ . A banda alargada na região de 330 nm proveniente da contribuição de transições eletrônicas do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , decorrente da presença dos grupos cromóforos na molécula, tais como C=C, C=N e C=S. Após a complexação, essa banda é exibida em torno de 360 a 375 nm, tanto para os complexos de paládio quanto para os complexos de platina. Este deslocamento batocrômico significativo reforça a coordenação dos ligantes ao centro metálico. Esse deslocamento para o vermelho é advindo de uma reorganização de densidade eletrônica proveniente da desprotonação do ligante que ocorre como consequência da coordenação. Essas observações também foram relatadas anteriormente em outros complexos de paládio(II) e platina(II) com estruturas semelhantes.<sup>54</sup> A Tabela 4.3 apresenta a atribuição das bandas para os compostos em relação as suas respectivas transições eletrônicas e absortividades molares.



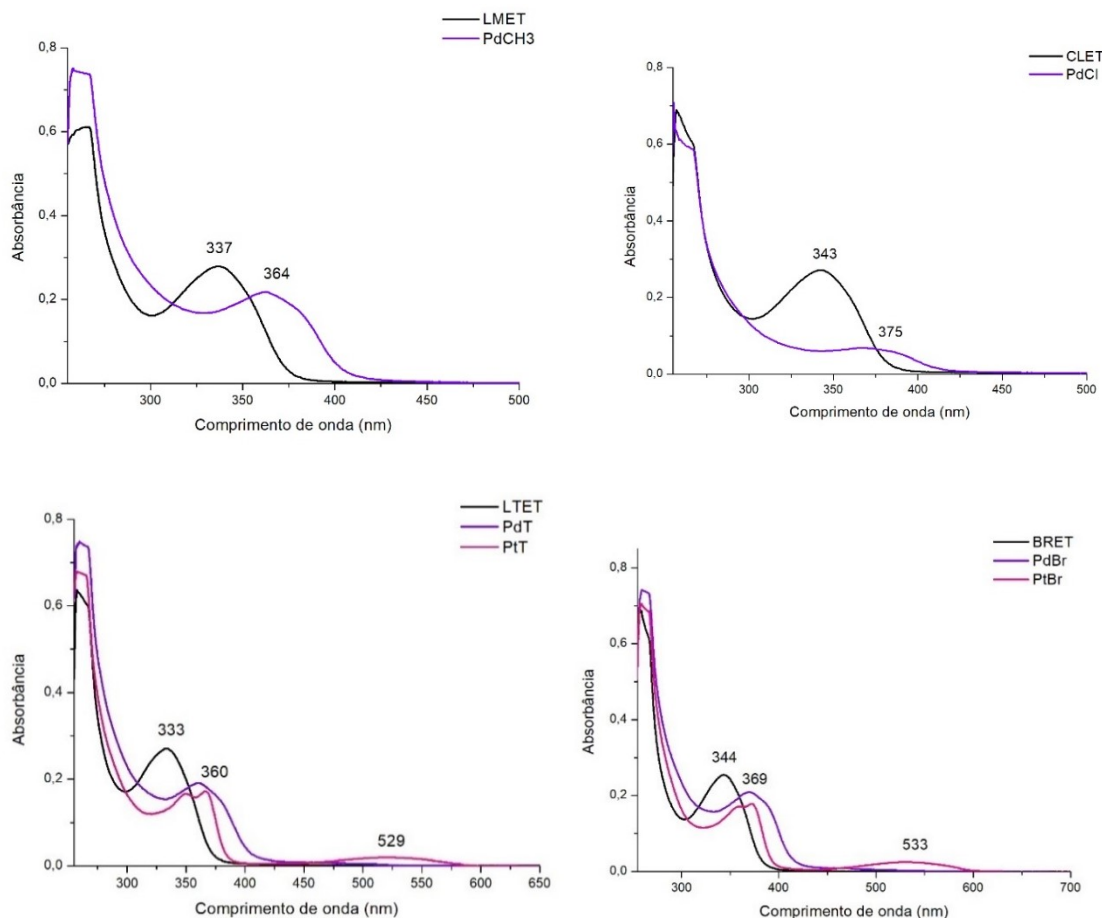


FIGURA 4.3 - Sobreposição dos espectros de U.V-Vis dos ligantes (preto) e seus complexos de Pd(II) (roxo) e Pt(II) (rosa) obtidos em DMSO na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

De acordo com dados da literatura, a banda próxima a 530 nm nos complexos de platina pode ser atribuída a transferência de carga ligante-metal  $S \rightarrow M$ . Esta banda é proveniente da excitação pela luz visível de um elétron do átomo de enxofre presente no ligante para um orbital d vazio da platina, possibilitada devido a sua configuração eletrônica  $d^8$ . Sendo assim, a presença dessa banda ainda reforça a coordenação do ligante ao centro metálico via átomo de enxofre. A identificação de bandas esperadas referentes as transições d-d é dificultada devido ao alargamento da banda LMCT, a qual pode se estender até a parte visível do espectro e conseqüentemente mascarar as bandas d-d.<sup>56</sup>

TABELA 4.3 - Atribuição das transições eletrônicas dos compostos.

Composto	Comprimento de onda (nm)	$\epsilon$ (molL <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Transição
BRMT	258	65000	$n \rightarrow \pi^*$
	343	26800	$\pi \rightarrow \pi^*$
BRT	259	62900	$n \rightarrow \pi^*$
	343	32400	$\pi \rightarrow \pi^*$
MMT	261	58900	$n \rightarrow \pi^*$
	336	23100	$\pi \rightarrow \pi^*$
TMT	258	12000	$n \rightarrow \pi^*$
	335	20800	$\pi \rightarrow \pi^*$
CLMT	266	12700	$n \rightarrow \pi^*$
	291	15000	$\pi \rightarrow \pi^*$
BRET	257	69100	$n \rightarrow \pi^*$
	343	25500	$\pi \rightarrow \pi^*$
CLET	257	68900	$n \rightarrow \pi^*$
	342	27100	$\pi \rightarrow \pi^*$
MET	265	61100	$n \rightarrow \pi^*$
	336	27900	$\pi \rightarrow \pi^*$
TET	257	63600	$n \rightarrow \pi^*$
	333	27000	$\pi \rightarrow \pi^*$
CLT	258	66800	$n \rightarrow \pi^*$
	342	41000	$\pi \rightarrow \pi^*$
PdBr	259	78900	$n \rightarrow \pi^*$
	370	23700	$\pi \rightarrow \pi^*$
PdCl	259	73800	$n \rightarrow \pi^*$
	369	20400	$\pi \rightarrow \pi^*$
PdT	260	76300	$n \rightarrow \pi^*$
	361	21800	$\pi \rightarrow \pi^*$
PdCH <sub>3</sub>	260	72300	$n \rightarrow \pi^*$
	362	20700	$\pi \rightarrow \pi^*$
PtBr	261	68100	$n \rightarrow \pi^*$
	372	17400	$\pi \rightarrow \pi^*$
	533	2500	LMCT
PtT	259	67900	$n \rightarrow \pi^*$
	368	17200	$\pi \rightarrow \pi^*$
	529	2000	LMCT

#### 4.4 – Ressonância Magnética Nuclear:

A caracterização dos compostos também foi realizada através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , DEPT-135 e HSQC. As atribuições dos sinais presentes nos espectros de RMN para os ligantes e complexos foram feitas com base no esquema de numeração descrito na Figura 4.4.

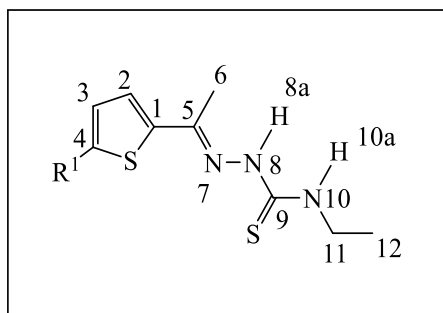


FIGURA 4.4 - Esquema de numeração para os compostos propostos.

De acordo com a similaridade estrutural entre os compostos, somente o ligante TET e seus respectivos complexos de paládio e platina foram selecionados para atribuição dos sinais e discussão em relação aos seus deslocamentos químicos. Sendo assim, os espectros de RMN dos demais compostos estão nos anexos.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o ligante TET está representado na Figura 4.5, no qual o sinal em 7,26 ppm é referente ao resíduo de  $\text{CH}_3\text{Cl}$  no solvente  $\text{CDCl}_3$  e 1,58 ppm a água presente no  $\text{CDCl}_3$ .<sup>104</sup> A partir da análise deste espectro é possível verificar a presença de um singlete mais desblindado em 8,62 ppm corresponde ao hidrogênio hidrazínico (H8a), confirmando a forma tiona em solução. Esse valor está próximo a faixa da literatura de 9,00-12,00 ppm relatada para o isômero E. A ausência de sinais de prótons na faixa de 14,00-15,00 ppm, normalmente é associada com a presença de próton hidrazina N-NH no isômero Z, reforçando a estrutura do ligante como isômero E na solução de DMSO.<sup>30,40,56</sup>

O tripleto em 1,29 ppm está associado aos hidrogênios do grupo metila CH<sub>3</sub> (12), os quais são mais blindados do que os hidrogênios do grupo metila CH<sub>3</sub> (6), uma vez que estes são adjacentes ao grupo CH<sub>2</sub> (11) que blinda de forma mais eficiente os hidrogênios do grupo metila. Os demais estão ligados a um carbono diretamente ligados a um átomo eletronegativo (N7), o qual retira densidade eletrônica do grupo metila CH<sub>3</sub> (C6), e conseqüentemente desblinda o núcleo dos hidrogênios, ocorrendo em 2,26 ppm no espectro. Vale ressaltar que o tripleto em 1,29 ppm é decorrente do acoplamento com os hidrogênios adjacentes do grupo CH<sub>2</sub> enquanto o sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metila (6) é um singlete, o que significa não ter hidrogênios vizinhos próximos, o que permitiria o acoplamento.

A ampliação da região próxima a 3,7 ppm mostra a presença de um multiplete aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub> que acoplam com os hidrogênios vizinhos do grupo CH<sub>3</sub> (12). A partir do espectro é possível inferir que os dupletos em 7,32 ppm e 7,27 ppm se referem aos hidrogênios H4 e H2 do anel tiofeno, respectivamente. Já a presença do hidrogênio H3 do heterociclo é caracterizada por um tripleto na região de 7,02 ppm, o qual acopla com os H2 e H4, sendo o hidrogênio mais blindado do heterociclo. Por fim, o singlete em 7,46 ppm confirma a presença do hidrogênio H10a presente no grupo N10-H10.

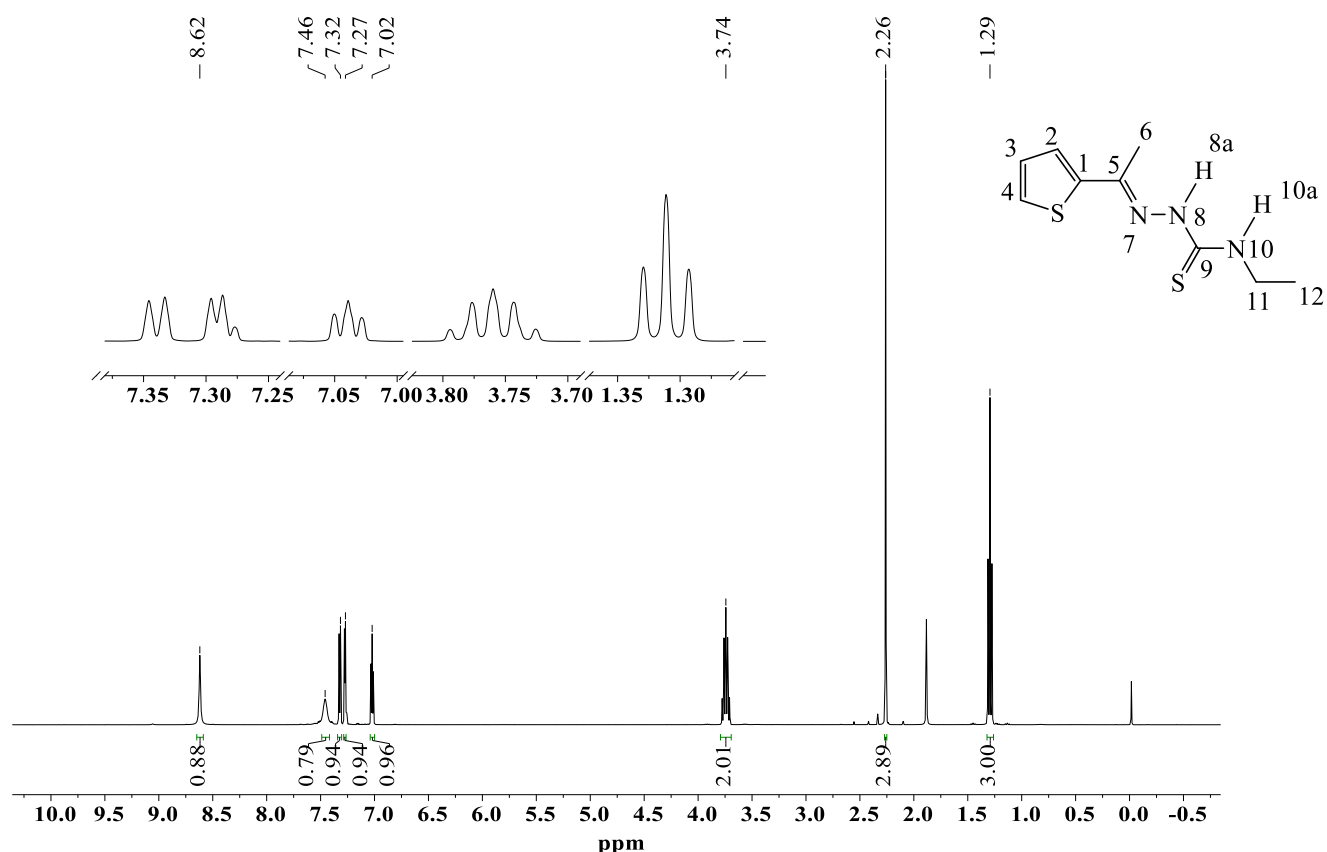


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o ligante TET em CDCl<sub>3</sub>.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do complexo PdT é elucidado na Figura 4.6, no qual é observado um sinal triplete localizado na região mais blindada do espectro em torno de 1,19 ppm, corresponde aos hidrogênios do grupo metila - CH<sub>3</sub> (12), enquanto os demais hidrogênios pertencentes ao outro grupo metila - CH<sub>3</sub> (6) foram atribuídos ao singlete próximo a 3,16 ppm. O sinal multiplete em torno de 3,48 ppm visualizado na ampliação do espectro caracteriza a presença dos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub> e os dupletos em 7,60 ppm e 7,56 ppm são vinculados a presença dos hidrogênios do tiofeno (H4 e H2). Já o triplete em 7,07 ppm está associado a presença do hidrogênio H3 do heterociclo tiofeno.

O surgimento de multipletos na região de 7 ppm referente aos hidrogênios da trifenilfosfina demonstra a coordenação ao centro metálico. Ao ampliar essa região observa-se multipletos mais desblindados em 7,7 ppm associados aos 6 hidrogênios em *orto* nos anéis fenil, os quais vão sentir mais a doação sigma da densidade eletrônica do fósforo para o centro metálico, e que

consequentemente, provoca uma desblindagem maior desses hidrogênios. Os demais hidrogênios *meta* e *para* estão mais afastados do fósforo e por isso se mostram um pouco mais blindados no espectro, os quais se localizam na região de 7,4 ppm.<sup>60</sup>

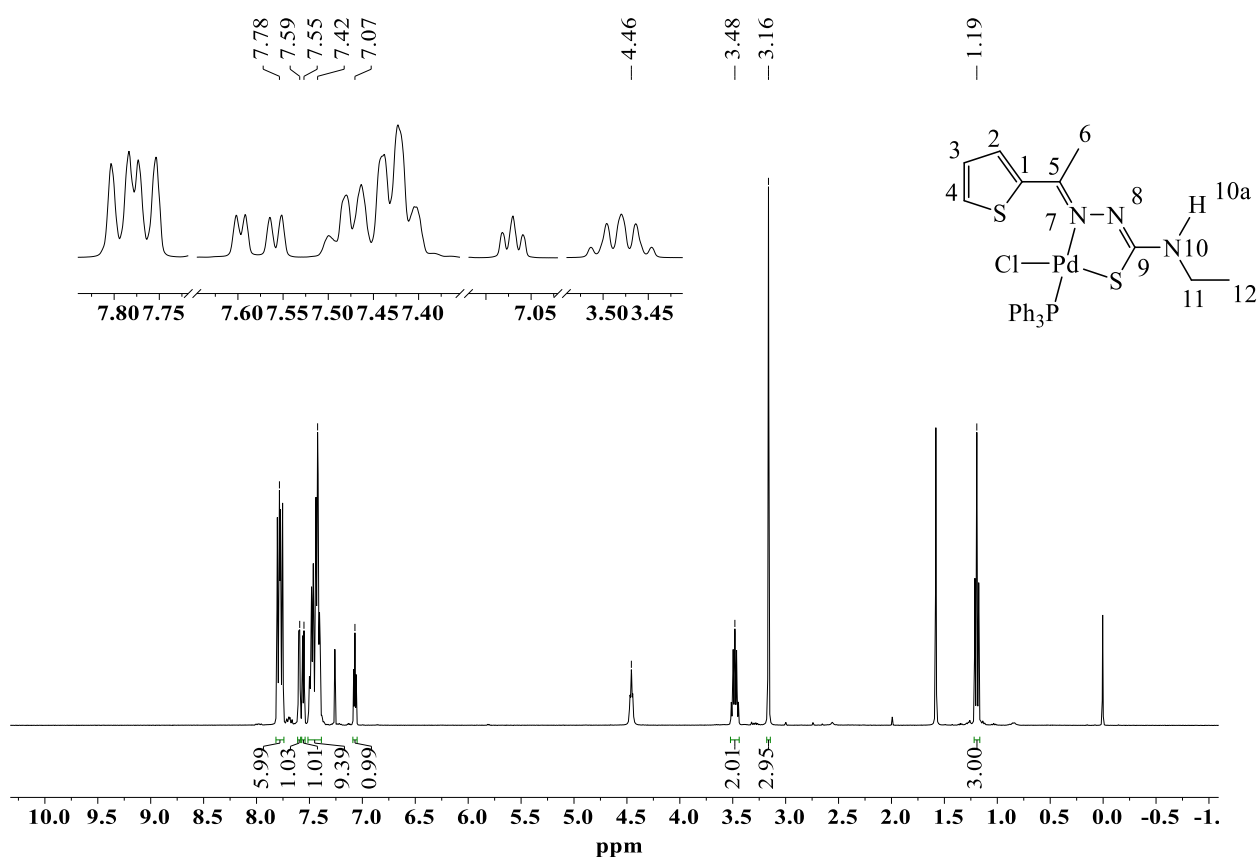


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o complexo PdT em CDCl<sub>3</sub>.

Ao sobrepor os espectros de ligante TET e complexo PdT, representado na Figura 4.7, é possível observar que os ligantes foram desprotonados em decorrência da coordenação ao CH<sub>3</sub> (6) metálico. Esse comportamento é evidenciado pelo desaparecimento do sinal mais desblindado. Analisando ambos os espectros, foi possível observar o sinal em 8,62 ppm correspondente ao hidrogênio hidrazínico (H8a), no ligante livre. No entanto, não foi possível notar sua presença no espectro do complexo.<sup>30</sup>

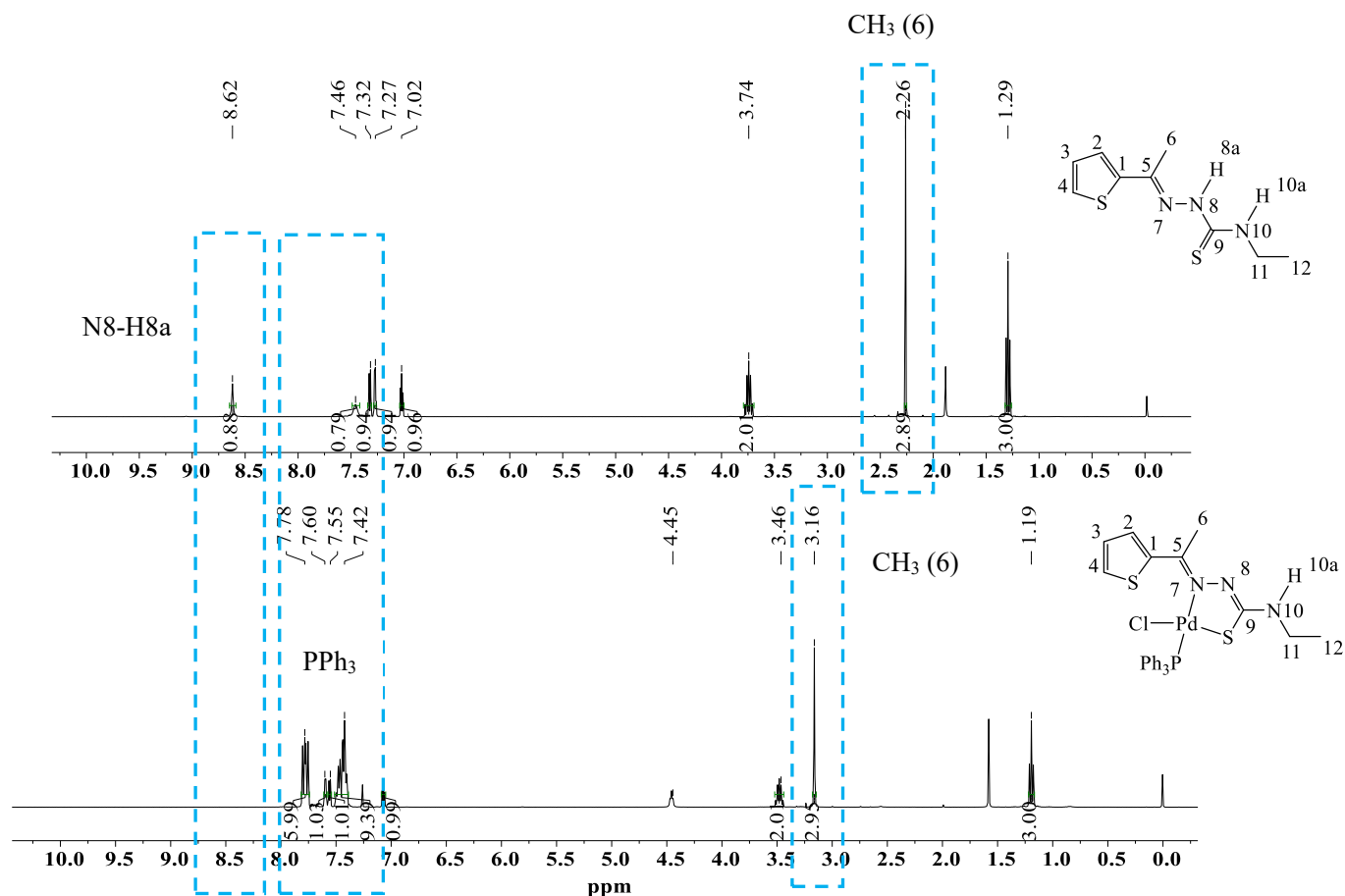


FIGURA 4.7 - Comparação entre os espectros de RMN <sup>1</sup>H do ligante TET e do complexo PdT em CDCl<sub>3</sub>.

O sinal em aproximadamente em 4,5 ppm, referente ao H10 é característico de TSC coordenada na forma aniônica.<sup>100</sup> Outro importante indicativo da ocorrência da coordenação é o deslocamento significativo do sinal referente aos hidrogênios -CH<sub>3</sub> (6) adjacente ao carbono da função azometina (CH<sub>3</sub>-C=N), assim no ligante este encontra-se em 2,26 ppm, e após a complexação, seu ambiente torna-se mais desblindado, ocorrendo em 3,16 ppm. Esse deslocamento é resultante do efeito indutivo, uma vez que o nitrogênio azometina (N7) doa densidade eletrônica para o centro metálico, simultaneamente esse fica mais deficiente em elétrons e tende a retirar densidade eletrônica dos átomos adjacentes como a metila. Desta forma, como consequência ocorre a diminuição de elétrons ao redor do núcleo dos hidrogênios o que os torna mais suscetíveis a sofrerem os efeitos do campo magnético aplicado. Tal comportamento reforça a coordenação via átomo de N7.

O RMN de  $^{31}\text{P}$  para o complexo PdT, representado na Figura 4.8, mostrou apenas um sinal em 28,05 ppm referente a trifenilfosfina coordenada, confirmando a obtenção de apenas um produto. Esse valor está próximo a valores citados na literatura para coordenação da trifenilfosfina ao paládio em  $\text{CDCl}_3$ .<sup>49</sup> Não foi observado sinais referentes a fosfina livre na região negativa do espectro e nem de óxido de trifenilfosfina em 25,94 ppm.

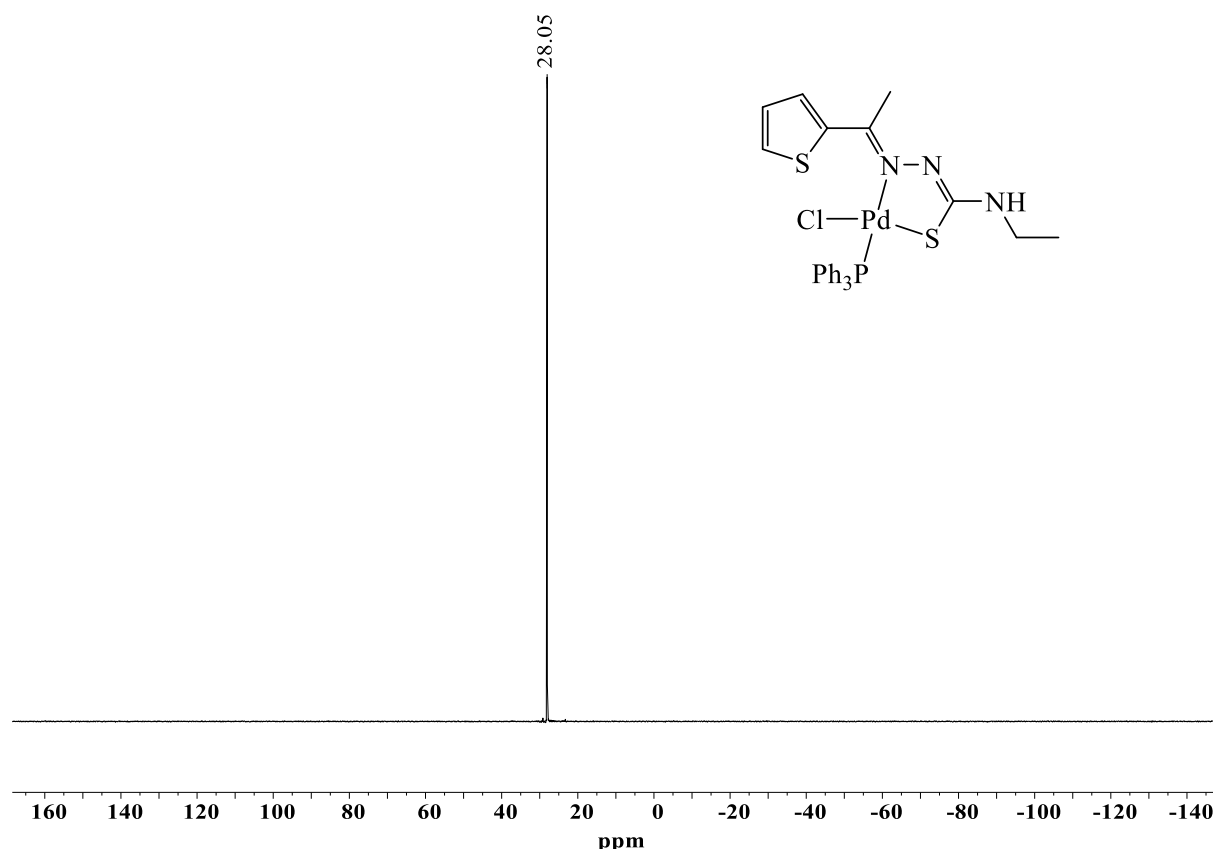


FIGURA 4.8 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

Para o seu análogo de platina PtT é visto um sinal pronunciado próximo a 17,24 ppm, referente a ligação Pt-P *trans* a ligação Pt-N, e dois sinais menores, um de cada lado do sinal principal localizados em 29,50 ppm e 4,98 ppm, os quais são originados pelo acoplamento entre o núcleo do átomo de  $^{31}\text{P}$  e o núcleo do átomo de  $^{195}\text{Pt}$ , o qual apresenta maior abundância (33,8%), formando dois sinais satélites do sinal principal como visto na Figura 4.9.<sup>81,105</sup>



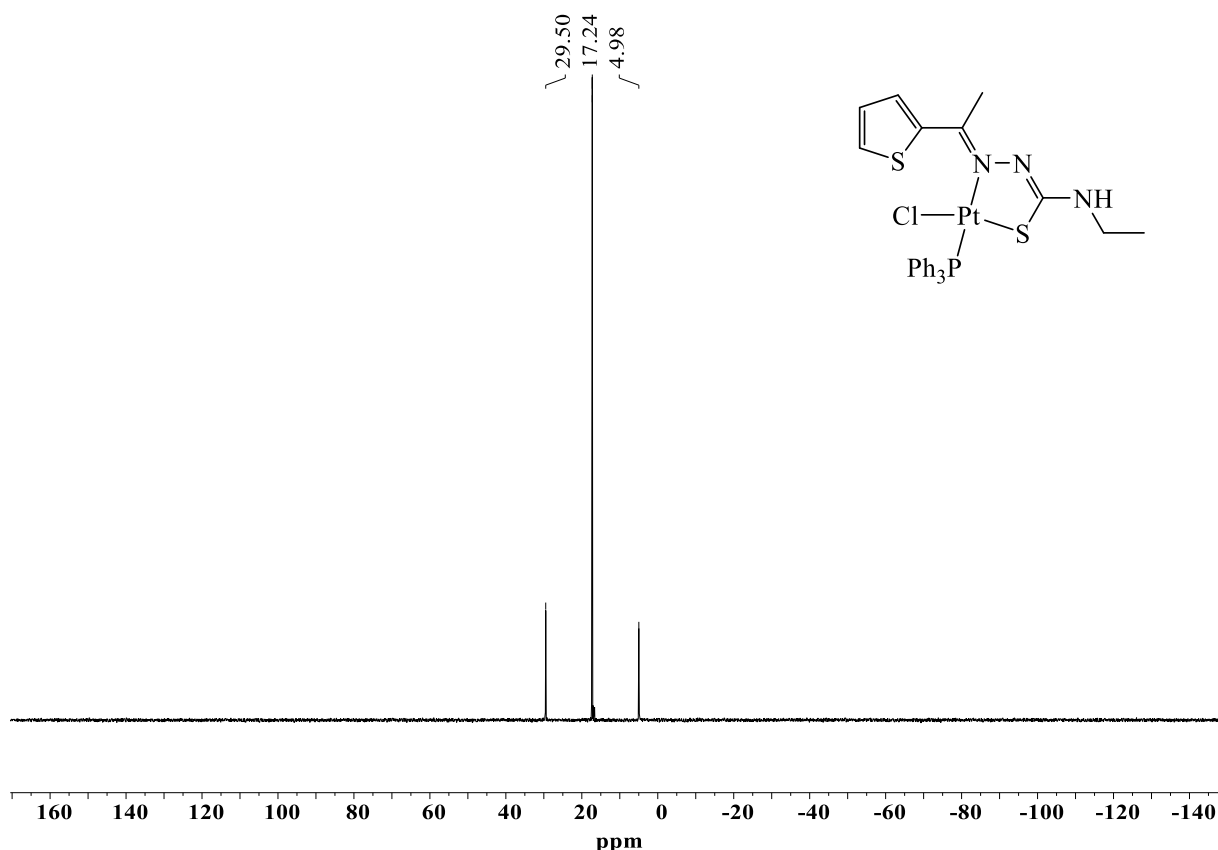


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PtT em  $\text{CDCl}_3$ .

As principais diferenças observadas quando se compara os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo PdT, representado em azul na Figura 4.10, e seu respectivo ligante se baseiam no deslocamento de 9,5 ppm da ligação C=S para uma região mais blindada do espectro, deslocando de 177,35 ppm para 167,82 ppm. Esse comportamento é decorrente da conversão da sua forma tiona em tiol promovida pela desprotonação do ligante, a qual provoca uma deslocalização da densidade eletrônica, sendo essa mais concentrada entre os átomos da ligação C9-N8 fazendo com que o carbono se torne mais blindado.<sup>54,100</sup>

Outro deslocamento significativo foi de 14,3 ppm correspondente a ligação C=N, a qual encontra-se em 142,60 ppm e desloca para 156,88 ppm, tornando-se mais desblindada devido a coordenação do N7 ao centro metálico. A coordenação promove a retirada da densidade eletrônica por efeito indutivo da ligação C=N e do grupo metila ( $-\text{CH}_3$ ) adjacente, o qual apresenta um deslocamento significativo de aproximadamente 11,8 ppm para uma região mais

desblindada, deslocando de 14,41 ppm para 26,20 ppm. Ambos os deslocamentos reforçam a coordenação via N7.<sup>55</sup>

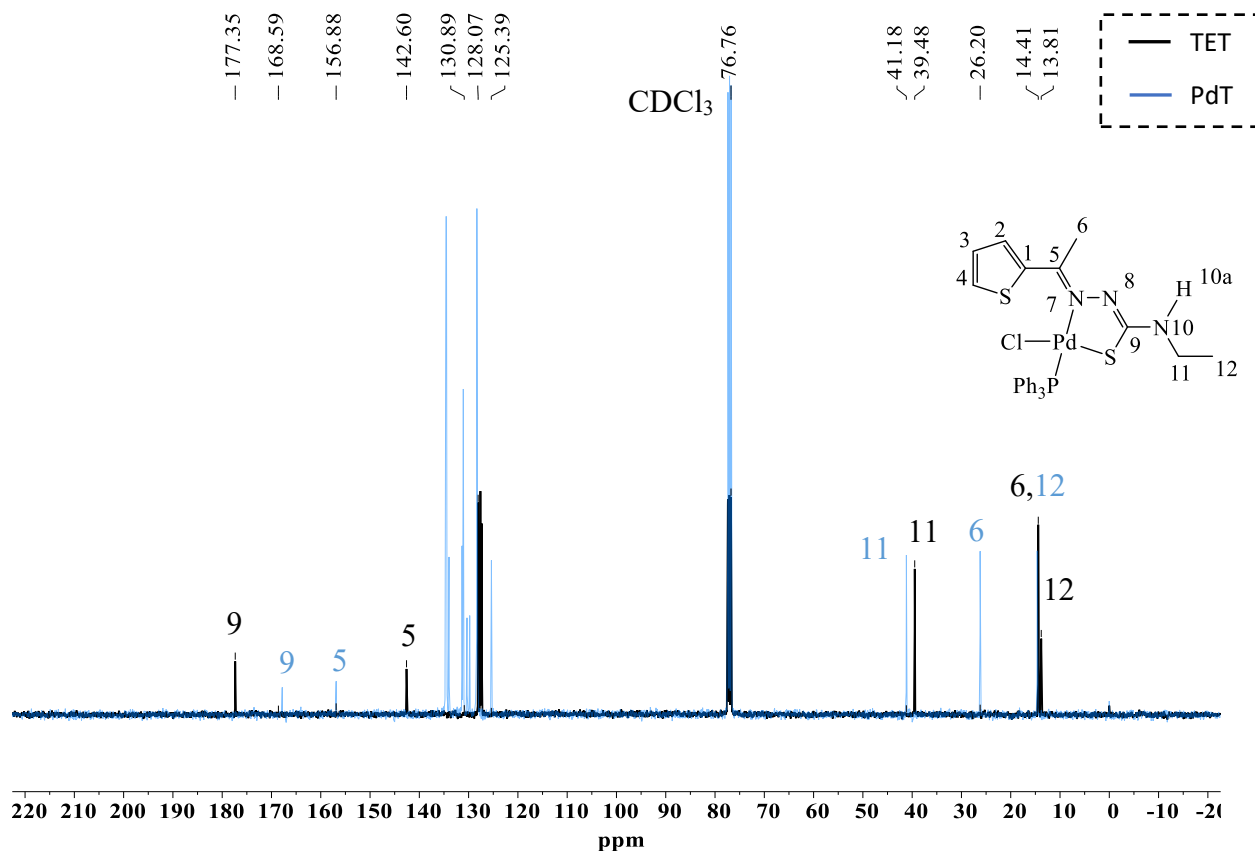


FIGURA 4.10 - Sobreposição dos espectros de RMN <sup>13</sup>C do ligante TET (preto) e do complexo PdT (azul) em CDCl<sub>3</sub>.

A atribuição dos demais sinais de carbono para os complexos foi realizada com o auxílio de análises complementares como o DEPT-135, sendo possível identificar o número de hidrogênios ligados a um determinado átomo de carbono. Desta forma, o grupo metileno (-CH<sub>2</sub>) pertencente ao grupo etil é situado na região negativa do espectro em 41,18 ppm como pode ser visto na Figura 4.11, o que corrobora com os dados obtidos com a análise de <sup>13</sup>C. Já os grupos metila (-CH<sub>3</sub>) e metino (-CH) contendo número ímpar de hidrogênios se localizam na fase positiva do espectro. Nesta análise não é possível verificar a presença de carbonos quaternários, sendo assim a ausência de carbonos na região entre 180 ppm a 129 ppm, os quais puderam ser confirmados pela análise de DEPT-135.

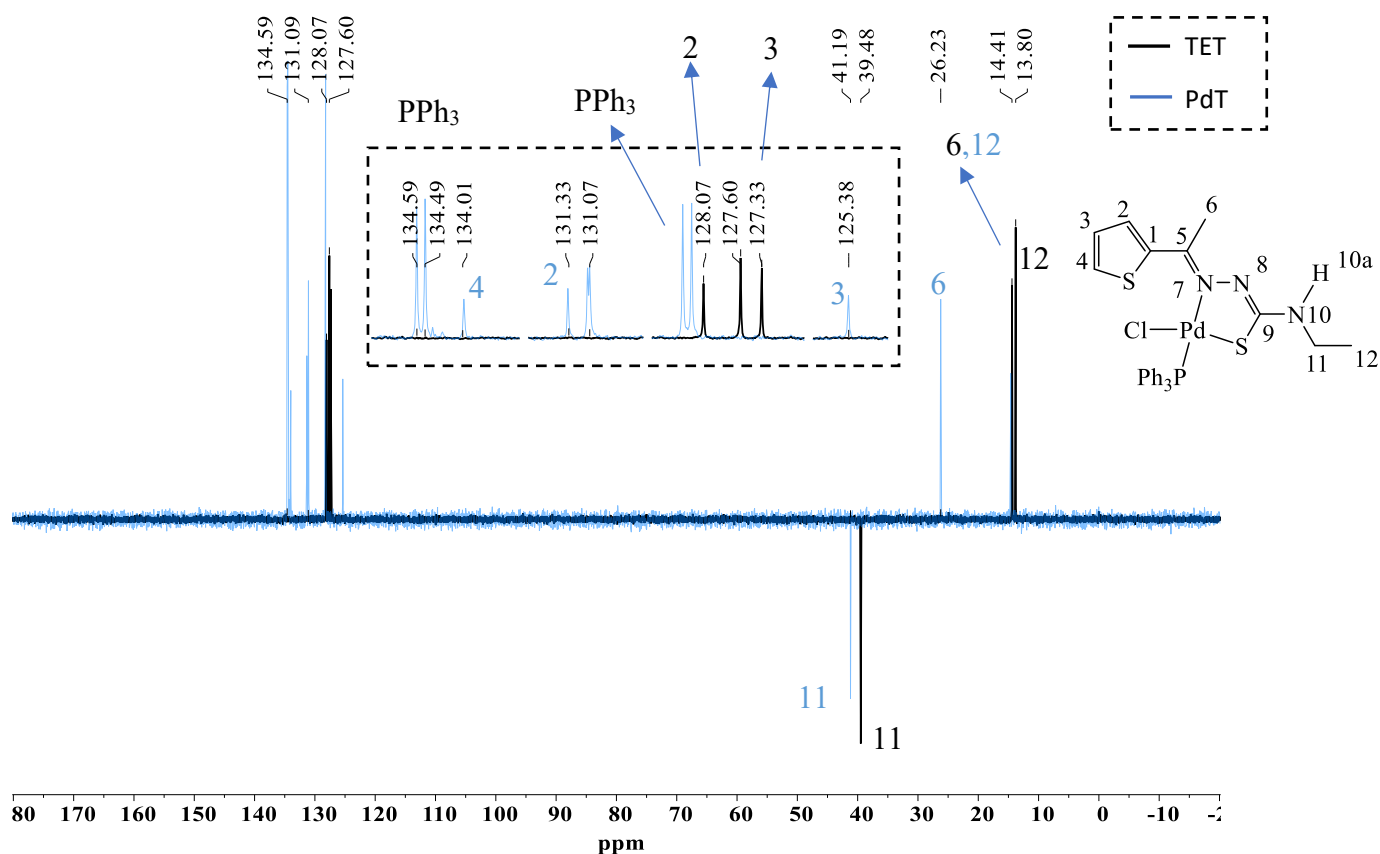


FIGURA 4.11 - Sobreposição dos espectros de RMN DEPT-135 do ligante TET (preto) e do complexo PdT (azul) em CDCl<sub>3</sub>.

A partir da técnica bidimensional HSQC é possível correlacionar os núcleos dos hidrogênios (eixo X) que acoplam com os núcleos dos carbonos (eixo Y). Sendo assim, verificou-se a partir da ampliação do espectro que o carbono que sofreu um grande deslocamento corresponde ao grupo metila adjacente a ligação azometina, uma vez que os hidrogênios em 3,1 ppm realmente estão associados ao carbono em 25 ppm, conforme representado na Figura 4.12, confirmando que esse sofreu maior desblindagem devido a coordenação ao centro metálico.

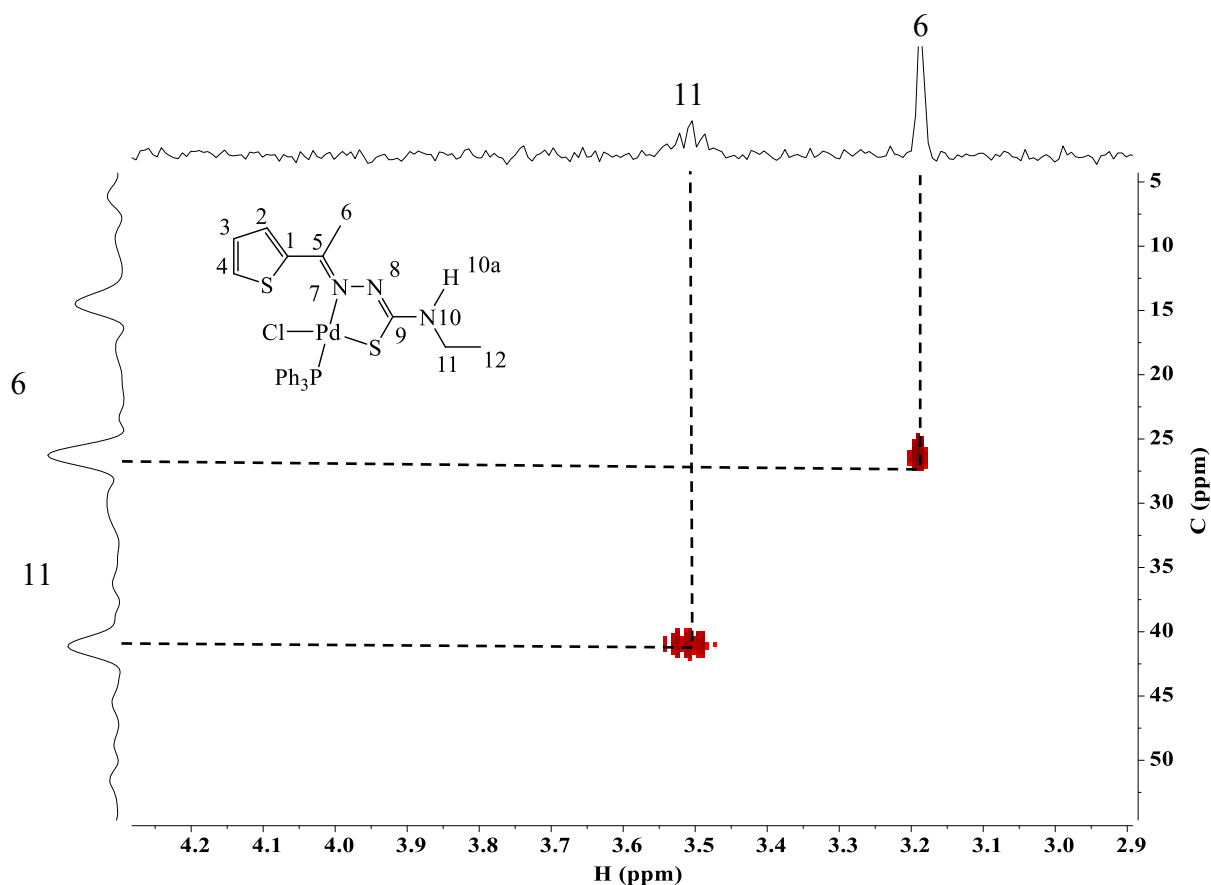


FIGURA 4.12 - Ampliação do mapa de contorno da correlação  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC do complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.5 - Difração de raios X

A análise de Difração de Raios X de monocristal fornece a elucidação da estrutura cristalina/molecular dos compostos de interesse de forma exata, a qual permite extrair informações como o comprimento, o ângulo das ligações e a posição dos átomos. A determinação dos átomos de hidrogênio por essa técnica torna-se inviável, uma vez que os raios X são espalhados por elétrons e os hidrogênios apresentam baixa densidade eletrônica, assim a posição destes é obtida através de cálculos ou pela difração de nêutrons.<sup>106</sup>

Nesse contexto, foi possível a obtenção de sete cristais aptos a difração de raios X de monocristal, na qual quatro estruturas cristalinas estão de acordo com as propostas no presente trabalho e encontram-se representadas na Figura 4.13. As demais estruturas cristalinas são provenientes de reações em que era observado a formação de subprodutos, onde uma delas elucida a coordenação

do ligante de forma monodentada via átomo de enxofre como pode ser visto na Figura 4.14, o que reforça a possibilidade de diferentes modos de coordenação. Os cristais dos complexos foram obtidos através da recristalização em acetonitrila, com exceção do complexo PdCH<sub>3</sub>.DMSO que foi obtido no solvente DMSO-*d*<sub>6</sub> e do complexo PdCl<sub>3</sub> em etanol, enquanto o ligante CLET foi obtido em clorofórmio.

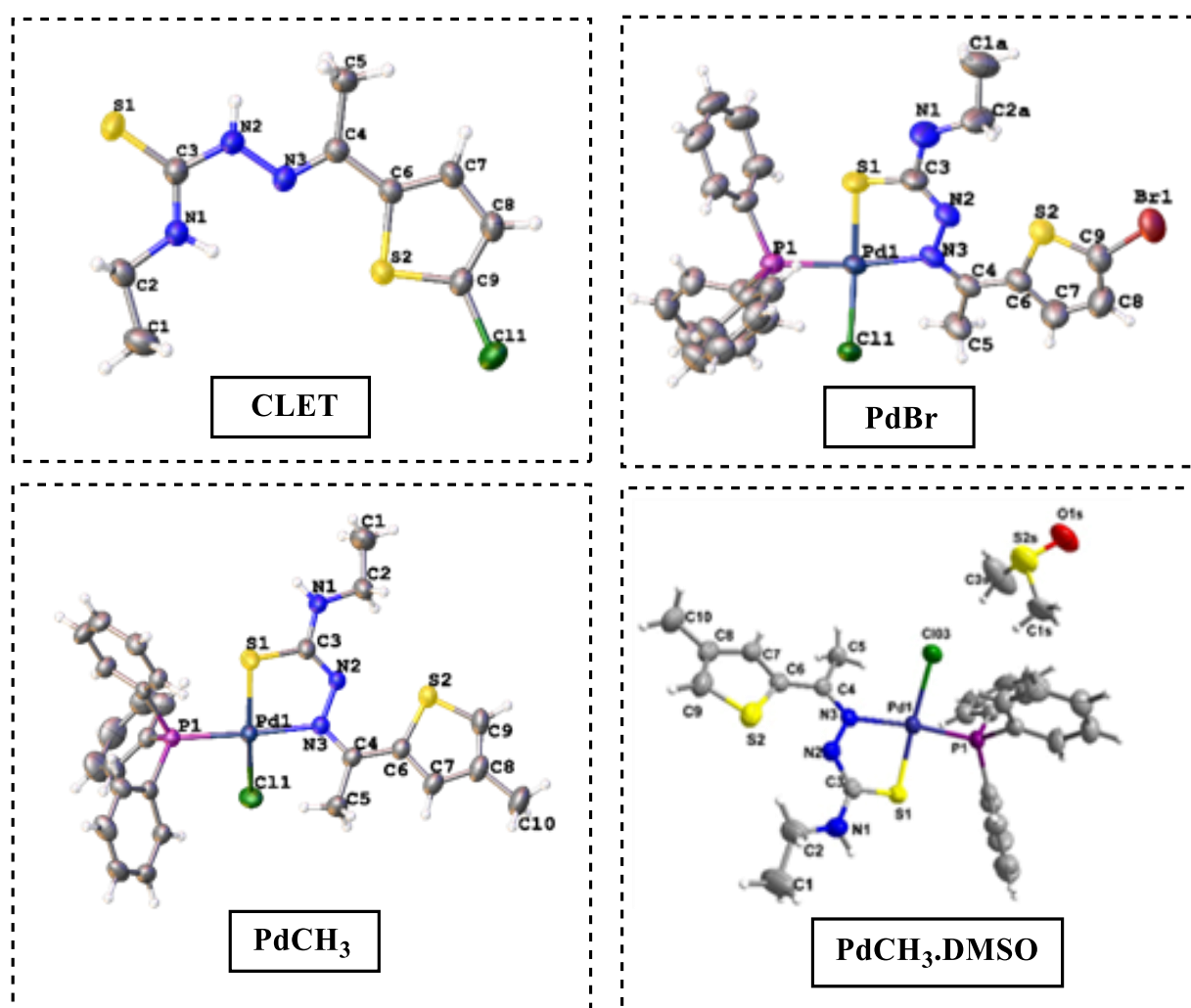


FIGURA 4.13 - Estruturas cristalográficas obtidas para o ligante e para os complexos. Os átomos estão representados no modelo ORTEP (elipsóides 30%).

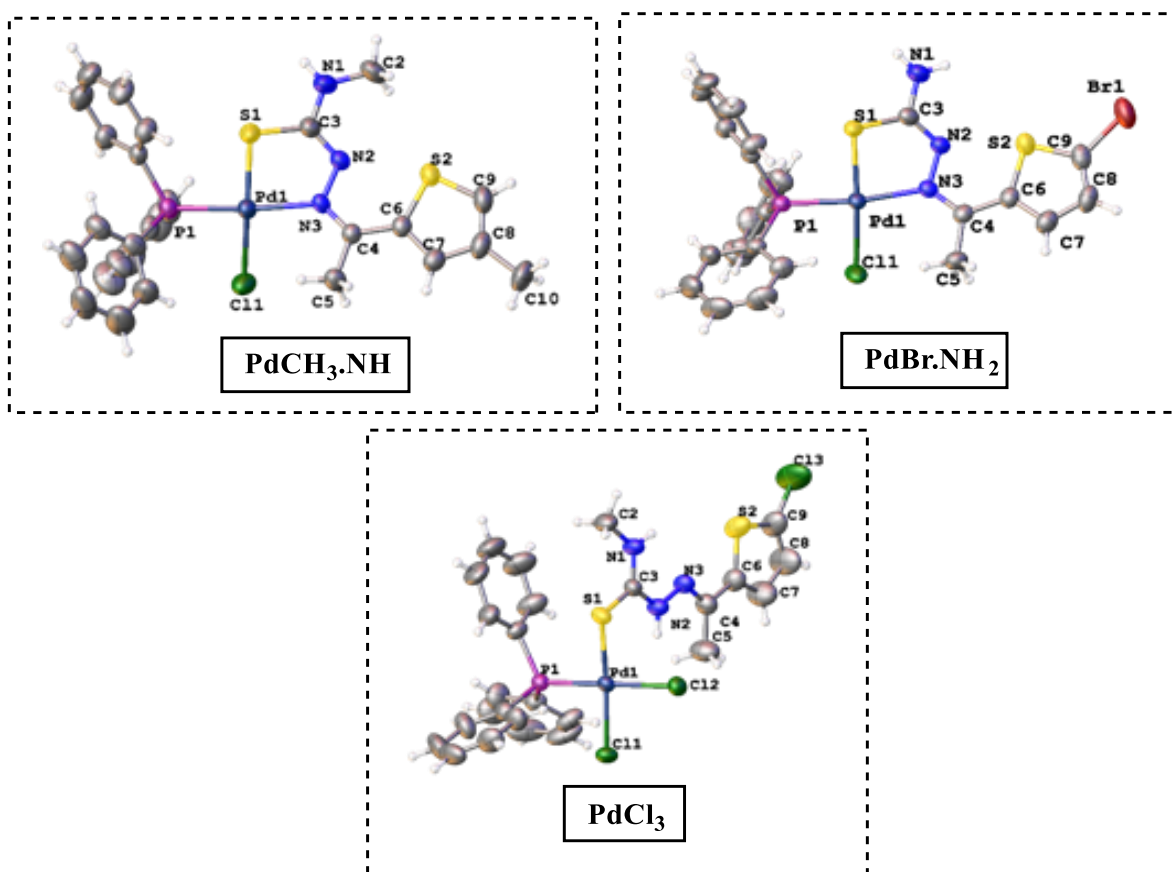


FIGURA 4.14 - Estruturas cristalográficas provenientes das reações com subprodutos. Os átomos estão representados no modelo ORTEP (elipsóides 30%).

A análise de difração de raios X em monocristal para o ligante CLET, cuja unidade assimétrica está representada na Figura 4.15, mostra que esse cristaliza no sistema monoclinico pertencendo ao grupo espacial  $P2_1/c$ . O comprimento da ligação N(3)-C(4) é 1,28 (2) Å está próximo ao da literatura que corresponde a 1,28 Å para C=N e 1,49 Å para C-N, o que confirma a presença do grupo funcional base de schiff (C=N) na molécula e consequentemente a obtenção do produto. Já o comprimento da ligação S(1)-C(3) é de 1,66 (18) Å, o que caracteriza a presença de uma ligação dupla indicando que o composto se encontra na forma tiona, uma vez que trabalhos evidenciam que o comprimento de ligação C=S é próximo de 1,67 (2) Å em compostos derivados de tiossemicarbazonas.<sup>24</sup>

O comprimento das principais ligações e seus respectivos ângulos estão descritos na Tabela 4.4.

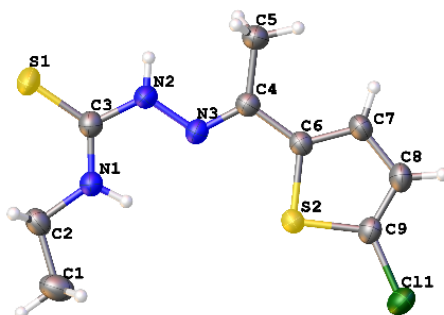


FIGURA 4.15 - Unidade assimétrica do composto CLET. As elipsóides térmicas são apresentadas com probabilidade de 30 %.

TABELA 4.4 - Comprimento e ângulo das principais ligações para o composto CLET.

Ligações	Comprimentos (Å)	Ligações	Ângulos (°)
S(2)-C(6)	1,72 (17)	N(1)-C(3)-N(2)	115,89 (16)
S(1)-C(3)	1,66 (18)	N(3)-C(4)-C(5)	124,83 (16)
N(3)-C(4)	1,28 (2)	C(4)-N(3)-N(2)	117,59 (15)
N(1)-C(3)	1,32 (2)	C(3)-N(1)-C(2)	124,85 (16)
N(3)-N(2)	1,36 (2)	C(9)-S(2)-C(6)	90,80 (8)
Cl(1)-C(9)	1,71 (18)	Cl(1)-C(9)-S(2)	120,64 (11)

No estado sólido, o composto apresenta duas interações intramoleculares, as quais estão representadas na Figura 4.16. Para cada uma dessas interações é observada a formação de um arranjo do tipo S(5) que estabiliza a estrutura, a primeira envolve os átomos C(2)-H(2B)···S(1) com comprimento de ligação de 2,99 (6) Å.<sup>60</sup> Já a segunda interação consiste nos átomos N(1)-H(1)···N(3) que exibe comprimento de ligação de 2,20 (14) Å. Esses valores estão próximos aos relatados por Sen e colaboradores em 2019 para compostos derivados de 2-acetil-5-cloro tiofeno e tiossemicarbazona.<sup>99</sup>

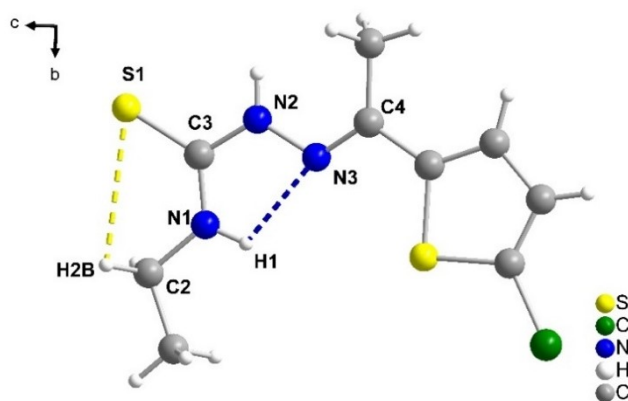


FIGURA 4.16 - Representação das interações intramoleculares para o composto CLET ao longo do eixo cristalográfico *a*.

O composto também apresenta interação intermolecular, como pode ser vista na Figura 4.17, envolvendo os átomos N(2)-H(2)⋯Cl(1) com comprimento de ligação de 2,77 (5) Å. Esse valor está próximo ao encontrado por Yaman e colaboradores em 2017 para compostos semelhantes, cujo valor de comprimento de ligação descrita foi de N – H⋯Cl: 2,60 Å.<sup>107</sup>

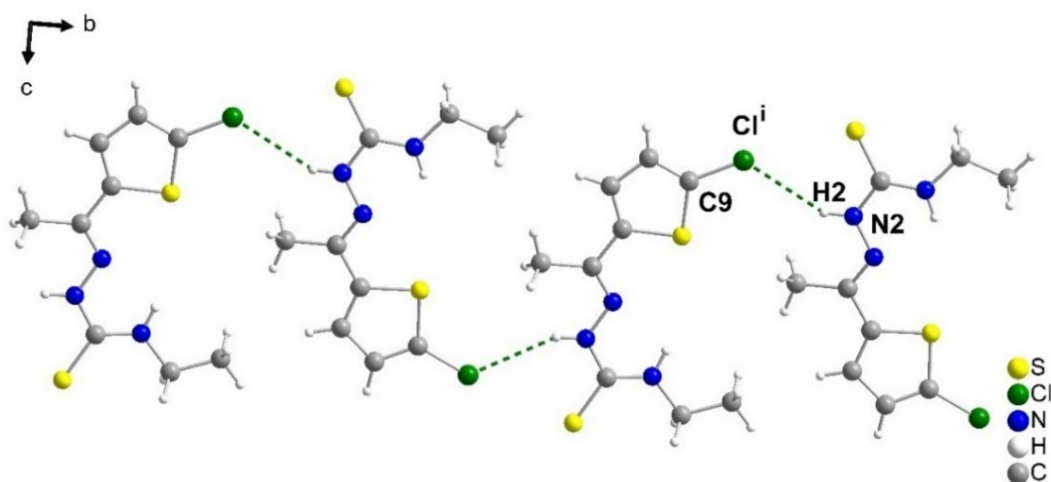


FIGURA 4.17 - Representação de interações intermoleculares para o composto CLET vistas ao longo do eixo cristalográfico *a*. Código de simetria: (i) 1-x, 0.5+y, 1.5-z.

A análise de difração de raios X em monocristal para o complexo PdBr mostra que este cristaliza em um sistema monoclinico e pertence ao grupo espacial  $P2_{(1)}/n$ . Os principais dados cristalográficos estão descritos na Tabela 4.5



e os demais dados cristalográficos coletados através dessa análise se encontram tabelados nos anexos.

TABELA 4.5 - Dados cristalográficos para o complexo PdBr.

<b>Dados do cristal</b>	
Sistema cristalino	Monoclinico
Grupo especial	P2 <sub>1</sub> /n
Temperatura (K)	293(2)
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	14.2389 (4), 11.2379 (3), 19.0398 (5)
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 111.601 (3), 90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	2832.69 (14)
<i>Z</i>	4
Tipo de radiação	Mo <i>K</i> $\alpha$ ( $\lambda$ = 0.71073)
<b>Dados da coleta</b>	
Nº de reflexões coletadas e independentes	61158, 6191
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0317
( $\sin \theta/\lambda$ ) max(Å <sup>-1</sup> )	0,717
<b>Dados do refinamento</b>	
<i>R</i> [ <i>F</i> <sup>2</sup> > 2 $\sigma$ ( <i>F</i> <sup>2</sup> )], <i>wR</i> ( <i>F</i> <sup>2</sup> )	0.0435, 0.1082
Nº de reflexões	61158
Nº de parâmetros	336

Na Tabela 4.6 estão descritos os principais comprimentos de ligação para o complexo PdBr, cuja unidade assimétrica está representada na Figura 4.18, e a partir dessa verificou-se que o comprimento da ligação N(3)-C(4) é de 1,29 (6) Å e que a ligação N(2)-C(3) também apresentou comprimento de ligação semelhante de 1,30 (6) Å. Esses valores indicam a presença de ligações duplas consecutivas, confirmando a presença de um sistema conjugado. Os mesmos estão próximos ao valor reportado na literatura para ligação C=N, o qual corresponde a

1,30 (3) Å.<sup>24,108</sup> O comprimento da ligação N(2)-C(3) correspondente a uma ligação dupla confirma a desprotonação do ligante gerando uma deslocalização da densidade eletrônica e conseqüentemente seu aumento nessa região, conferindo um caráter  $\pi$  a ligação. Esses valores de comprimento de ligação estão bem próximos aos descritos por Lobana e colaboradores para compostos semelhantes.<sup>103</sup>

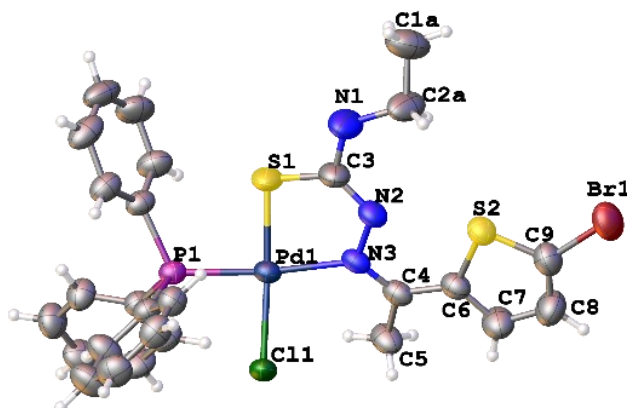


FIGURA 4.18 - Representação da unidade assimétrica para o composto PdBr. As elipsóides térmicas são apresentadas com probabilidade de 30 %.

A coordenação do ligante ao centro metálico na sua forma aniônica ainda é reforçada pelo comprimento da ligação S(1)-C(3) de 1,72 (5) Å, uma vez que difere do comprimento de ligação de 1,67 (3) Å descrito na literatura para C=S em tiossemicarbazonas livres.<sup>108,109</sup> O aumento do comprimento de ligação caracteriza a diminuição do caráter  $\pi$ .

TABELA 4.6 - Comprimentos de ligação selecionados para o complexo PdBr.

Ligações	Comprimento (Å)
N(3)-C(4)	1,29 (6)
N(2)-C(3)	1,30 (6)
S(1)-C(3)	1,72 (5)
Pd(1)-N(3)	2,13 (4)
Pd(1)-S(1)	2,23 (12)
Pd(1)-Cl(1)	2,33 (11)
Pd(1)-P(1)	2,25 (12)

A coordenação do ligante via átomos de N e S é evidenciada pelos valores de distâncias de ligação para Pd(1)-N(3) e Pd(1)-S(1) de 2,13 (4) Å e 2,23 (12) Å, respectivamente. Estes estão próximas da soma dos raios covalentes para os átomos envolvidos, isto é 2,03 Å para Pd—N e 2,30 Å para Pd—S.<sup>110</sup> Sendo assim, os dados cristalográficos evidenciam que o ligante se coordena ao centro metálico na sua forma bidentada. Os demais sítios de coordenação são ocupados por um átomo de fósforo do ligante trifenilfosfina *trans* ao átomo de nitrogênio da tiossemicarbazona, como proposto, e um ligante clorido.<sup>53,81</sup> A ligação Pd(1)-Cl(1) exibe comprimento de ligação de 2,33 (11) Å enquanto a ligação Pd(1)-P(1) apresenta comprimento de 2,25 (12) Å, cujos valores estão de acordo com a literatura.<sup>21,49,52</sup> A maior ligação Pd-Cl com o metal e isso provavelmente se deve ao fato de que o cloro atua como ligante  $\pi$  doador, o que faz com que essa ligação se torne mais fraca. Esse comportamento também é influenciado pelo efeito *trans* exercido pela fosfina, o qual provoca um alongamento da mesma.<sup>111</sup>

Na Tabela 4.7 é visto que os ângulos *trans* entre os átomos S(1)-Pd(1)-Cl(1) é 169,80 (6)° e N(3)-Pd(1)-P(1) é 172,44 (10)° desviam consideravelmente do ângulo ideal de 180° causando distorção na geometria quadrática plana do complexo.<sup>21</sup>

TABELA 4.7 - Principais ângulos selecionados para o composto PdBr.

Ligações	Ângulos (°)
S(1)-Pd(1)-Cl(1)	169,80 (6)
N(3)-Pd(1)-P(1)	172,44 (10)
N(3)-Pd(1)-Cl(1)	99,25 (10)
N(3)-Pd(1)-S(1)	82,53 (10)
P(1)-Pd(1)-Cl(1)	87,10 (4)
S(1)-Pd(1)-P(1)	90,50 (5)

A não planaridade da molécula foi verificada o traçar um plano sobre os átomos não-hidrogenóides do composto, demonstrado na Figura 4.19, observou-se que o cloro apresenta ângulo diedro de 29,04° em relação a ligação C(4)-N(3).

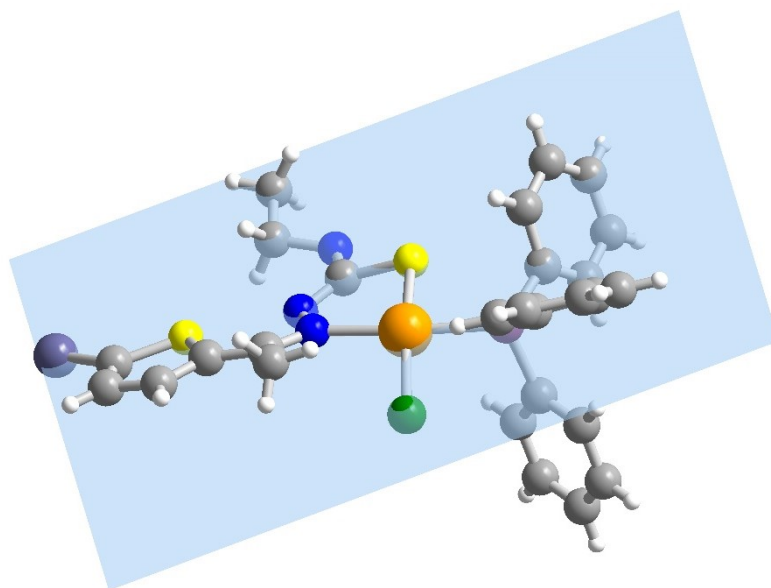


FIGURA 4.19 - Plano traçado nos átomos não-hidrogenóides do complexo PdBr.

#### 4.5.1 - Interações intramoleculares e intermoleculares

As interações intramoleculares observadas para o complexo PdBr fornecem a formação de três arranjos do tipo S(6) e um arranjo do tipo S(9) para o complexo 1, conforme ilustrado na Figura 4.20. Dentre os arranjos do tipo S(6), dois deles são provenientes de interações entre o átomo de Cl e os hidrogênios H5

e H16 pertencentes ao grupo metil adjacente ao grupo azometina, e um dos grupos fenilas da trifenilfosfina. As interações C(5)-H(5A)⋯Cl(1) e C(16)-H(16)⋯Cl(1) apresentam comprimento de ligação de 2,62 (13) Å e 2,77 (12) Å, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os dados da literatura, cujo valor descrito para interação H⋯Cl é de 2,60 Å.<sup>99</sup> Estas interações também se mostraram menores do que a soma dos raios de van der Waals dos átomos envolvidos, a qual é caracterizada como 3,0 Å.<sup>112</sup>

A interação intramolecular de hidrogênio correspondente a C(32)-H(32)⋯S(1) também fornece um arranjo S(6), a qual exibe um comprimento de ligação de 2,95 (14) Å. Este valor de interação está de acordo com os dados da literatura, os quais são próximos de 3,00 Å para S⋯H.<sup>109</sup> Outra interação intramolecular de hidrogênio do tipo S⋯H foi observada, a qual forneceu um arranjo S(9) envolvendo os átomos C(2A)-H(2AB)⋯S(2), onde está apresentou comprimento de ligação de 3,00 (15) Å.

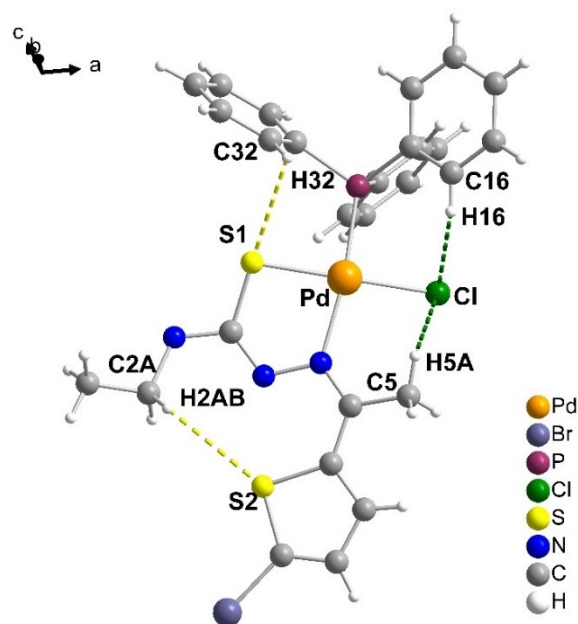


FIGURA 4.20 - Representação das interações intramoleculares presentes no complexo PdBr ao longo do eixo cristalográfico *b*.

Para o composto PdBr são observadas interações intermoleculares do tipo C(7)-H(7)⋯Cl, a qual exibe um comprimento de ligação de 2,66 (14) Å. Além

destas, as moléculas estão conectadas entre si por interações entre o H(5B) pertencente ao grupo metila e o centroide do anel fenil da trifenilfosfina da molécula vizinha. Assim, para esse tipo de interação foi encontrado através do programa DIAMOND uma distância de 3,08 (1) Å para C(5)-H(5B)⋯Cg. Este valor está de acordo com a literatura, onde a soma dos raios de van der Waals é de 2,9 Å para C⋯H.<sup>68,112</sup> Ambos os tipos de interações intermoleculares estão representados na Figura 4.21.

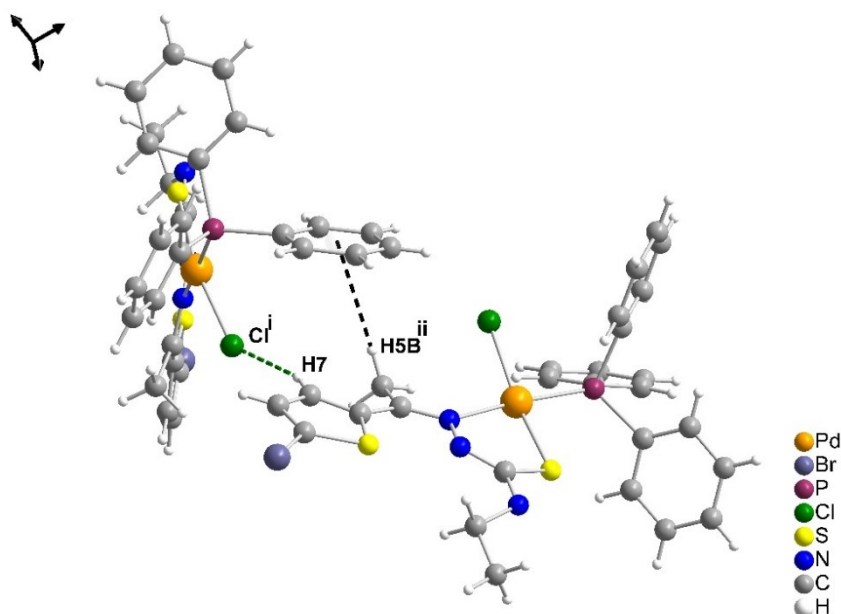


FIGURA 4.21 - Interações intermoleculares presentes no complexo PdBr ao longo do eixo cristalográfico *ab*. Código de simetria: (i) 0.5-x,-1.5+y,-1.5-z (ii) x,-1+y,z.

Através dos tipos de interações observados foi possível verificar que o átomo de cloro atua como um receptor trifurcado estabelecendo duas ligações intramoleculares e uma intermolecular como descritas anteriormente.<sup>113</sup> As interações intermoleculares permitem a formação de redes cristalinas tridimensionais visto ao longo do eixo cristalográfico *ab* como elucidado na Figura 4.22. As interações intramoleculares e intermoleculares observadas para o complexo PdBr estão descritas na Tabela 4.8.

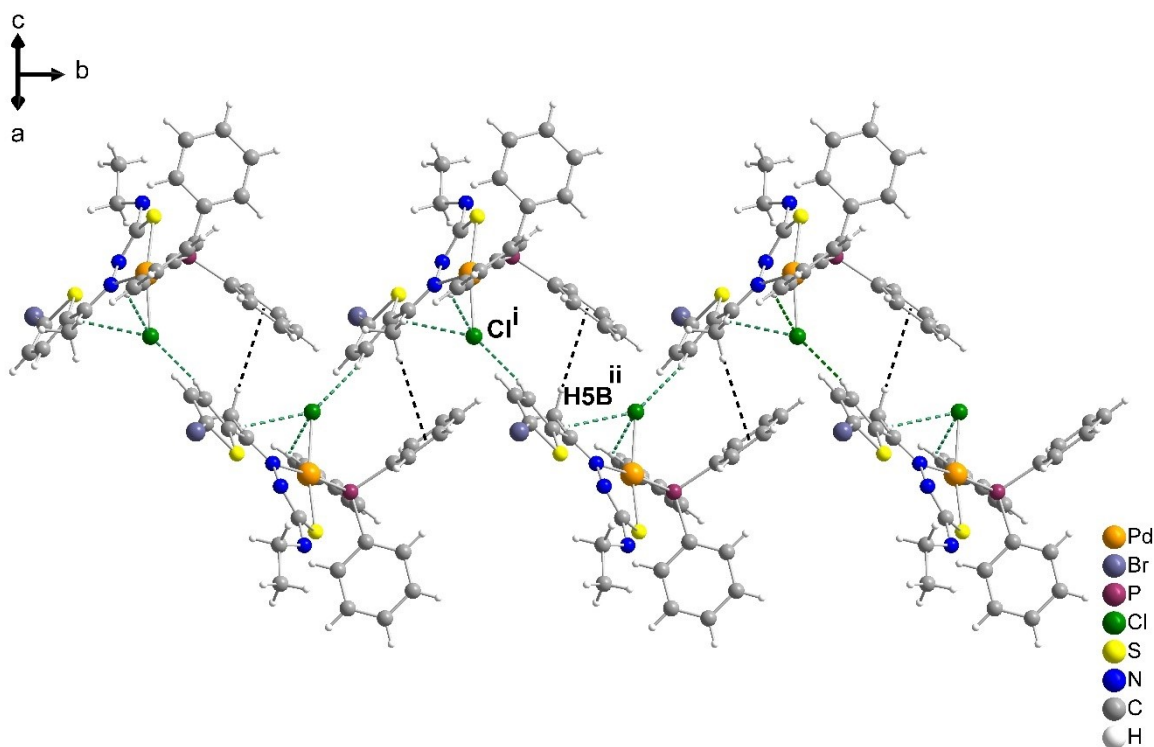


FIGURA 4.22 - Representação da rede tridimensional a partir de interações intermoleculares ao longo do eixo cristalográfico *ab* para o complexo PdBr. Código de simetria: (i)  $0.5-x, -1.5+y, -1.5-z$  (ii)  $x, -1+y, z$ .

TABELA 4.8 – Dados referentes as interações de hidrogênio identificadas na estrutura cristalina do complexo PdBr.

$D-H\cdots A$	$d(D-H)$ , Å	$d(H\cdots A)$ , Å	$d(D\cdots A)$ , Å	$\angle DHA$ , °
C(5)—H(5A)⋯Cl(1)	0,96	2,62	3,23	121,56
C(16)—H(16)⋯Cl(1)	0,93	2,77	3,41	127,32
C(32)—H(32)⋯S(1)	0,93	2,95	3,00	84,35
C(2A)—H(2AB)⋯S(2)	0,97	3,00	3,49	112,56
C(7)—H(7)⋯Cl(1)	0,93	2,66	3,55	159,02
C(5)-H(5B)⋯Cg	0,96	3,08	4,02	166,73

#### 4.6 - Espectrometria de massas:

A técnica de espectrometria de massas foi realizada com a finalidade de confirmar a obtenção da estrutura proposta através da identificação do íon molecular dos complexos. Desta forma, a partir dos dados resultantes foi possível observar que os valores teóricos correspondentes ao pico do íon molecular estão

próximos aos valores experimentais como estão descritos na Tabela 4.9 sugerindo a obtenção dos compostos esperados.

TABELA 4.9 - Dados de Espectrometria de massas para os complexos.

Composto	m/z		Erro (ppm)
	Teórico	Experimental	
PdBr	706,9212	706,9292	11,3
PdT	629,0107	629,0193	13,7
PdCl	662,9718	662,9807	13,4
PdCH <sub>3</sub>	643,0264	643,0357	14,5

O espectro proveniente da análise de Espectrometria de Massas representado na Figura 4.23 para o composto PdBr é constituído do pico do íon molecular em  $m/z$  706,9292 atribuído a presença do complexo e os demais picos correspondentes ao padrão isotópico de paládio. Dentre esses, é possível verificar um pico de alta intensidade em  $m/z$  673,9519 correspondente ao fragmento  $[Pd-Cl]^+$ .

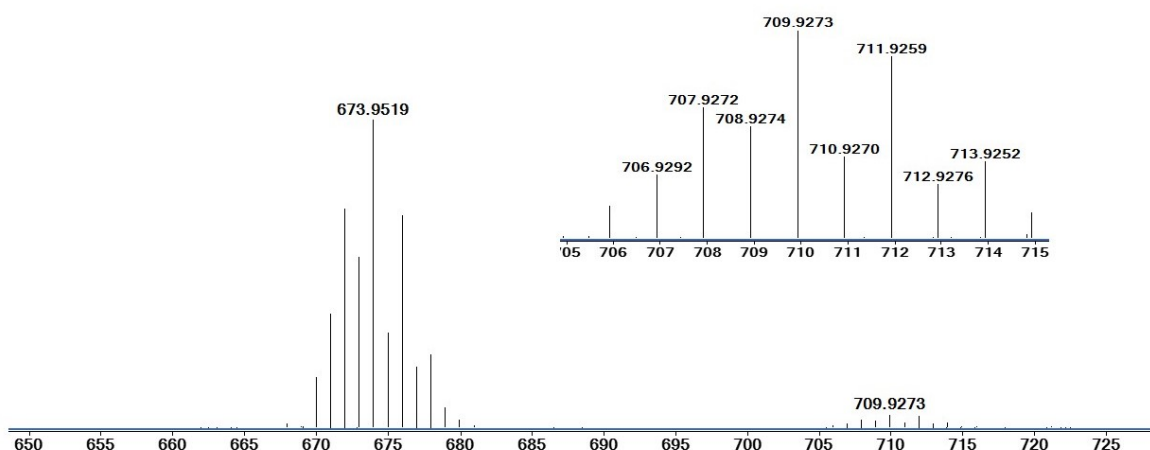


FIGURA 4.23 - Espectro de massas para o composto PdBr em  $m/z$ .

#### 4.7 - Coeficiente de Partição:

A determinação do coeficiente de partição de potenciais agentes antineoplásicos é de grande relevância, pois este é um dos fatores que interferem



nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de tais compostos. A lipofilicidade é determinada através da razão da distribuição do fármaco entre um solvente não miscível com a água e uma fase aquosa. Esta razão permite determinar o balanço entre as propriedades lipofílicas e hidrofílicas, a partir da concentração na parte não-ionizada e ionizada da molécula. A fase oleosa mais comumente usada é o n-octanol, pois este é constituído por cadeias lipofílicas e grupos hidrofílicos, bem como exibe a capacidade para captar moléculas de água, e seus parâmetros de solubilidade são semelhantes aos das membranas celulares.<sup>114</sup>

Por meio da absorbância média, na região do UV-vis, obtida das soluções de complexo em n-octanol, o valor da concentração dos complexos em n-octanol e água foi determinado a partir da curva padrão, previamente obtida. A curva padrão registrada para o complexo PdT está representada na Figura 4.24, a qual foi proveniente de dez adições sucessivas da solução do complexo em n-octanol. A partir da reta obtida através da curva padrão foi possível obter os valores de coeficiente de partição para os complexos.

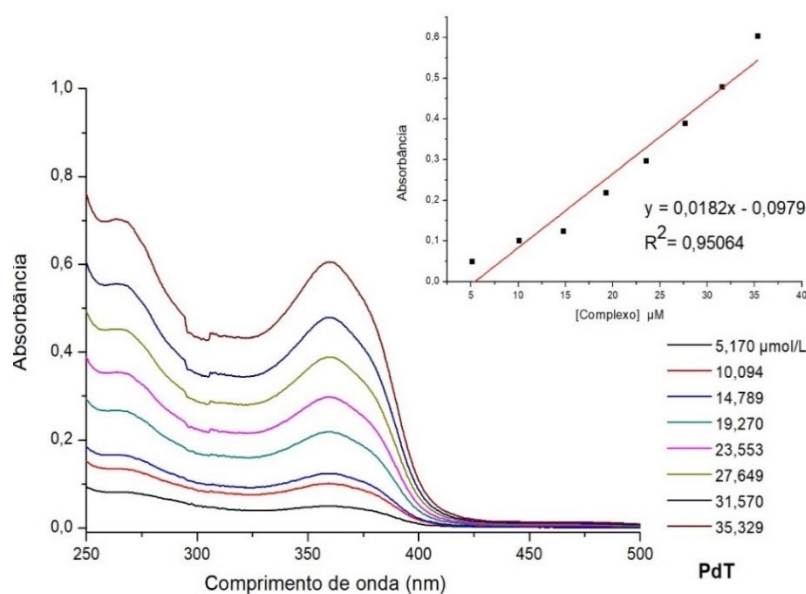


FIGURA 4.24 - Curva padrão de Lipofilicidade do composto PdT pela técnica de Ultravioleta-visível obtida a partir de oito adições sucessivas da solução do complexo  $2,12 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$  em n-octanol em uma cubeta contendo 2500 µL de n-octanol

Os valores negativos de log P, representados na Figura 4.25, indicam que todos os compostos possuem maior afinidade pela fase aquosa do que pela fase orgânica, mas dentre eles os complexos PdBr e PtT foram os mais particionados na solução de n-octanol. Adicionalmente, ao se comparar com a literatura, foi notado que todos os compostos em estudo apresentaram lipofilicidade maior do que os agentes quimioterápicos de platina amplamente usados atualmente como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, os quais apresentaram log P de -2,53, -2,3 e -1,76, respectivamente.<sup>115</sup> Tendo isto em vista, os compostos apresentam um coeficiente de partição adequado para promover a permeação através da membrana celular, e consequentemente, o acúmulo próximo à alvos biológicos de interesse. Essa inferência ainda é suportada pelas extensões da Regra dos cinco de Lipinski, as quais foram criadas para melhorar as estimativas de toxicidade e predizerem quais moléculas são promissoras a fármacos, para tal, os compostos devem possuir log P na faixa ideal entre -0,4 a +5,6.<sup>116</sup>

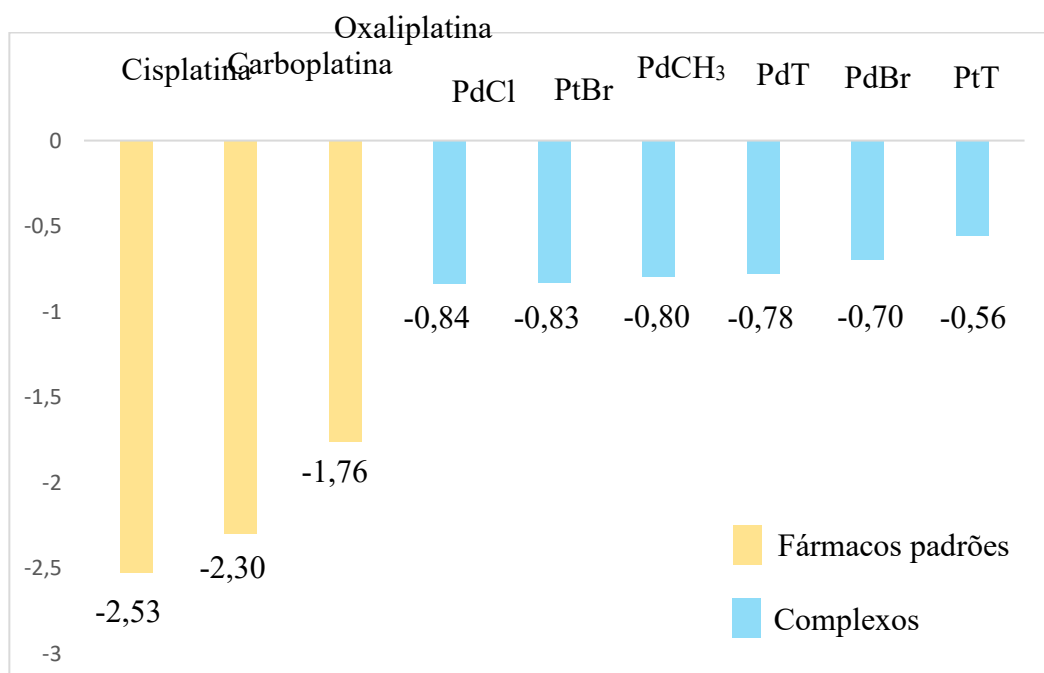


FIGURA 4.25 - Comparação entre os coeficientes de partição dos complexos obtidos e dos fármacos padrões amplamente conhecidos.

## **4.8 - Estudo de estabilidade**

### **4.8.1 - Estudo de estabilidade em DMSO por RMN:**

Os complexos foram avaliados em relação a sua capacidade de se manterem estáveis em DMSO e na mistura DMSO-D<sub>2</sub>O/DMEM nos tempos de 0, 24 e 48h, tais condições foram usadas com a finalidade de validar os ensaios biológicos posteriores, uma vez que a solução estoque dos complexos é feita em DMSO e as análises em uma mistura DMSO/H<sub>2</sub>O. Por meio da sobreposição dos espectros de RMN de <sup>31</sup>P, nos correspondentes tempos, foi verificado que o sinal em 29,7 ppm, correspondente a trifetilfosfina coordenada não sofreu alterações significativas no intervalo de tempo avaliado, conforme pode ser visto nas Figuras 4.26 e 4.27 para o complexo PdBr. O comportamento observado indica que o ambiente químico em que o átomo de fósforo se encontra não é afetado de modo significativo, dessa forma, pode-se inferir que a estrutura não sofre mudanças drásticas. Portanto, os complexos apresentam estabilidade satisfatória para a execução dos ensaios posteriores.

Adicionalmente, a sobreposição dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H mostrou que não há alterações significativas na estrutura nas condições avaliadas, como demonstrado na Figura 4.28.

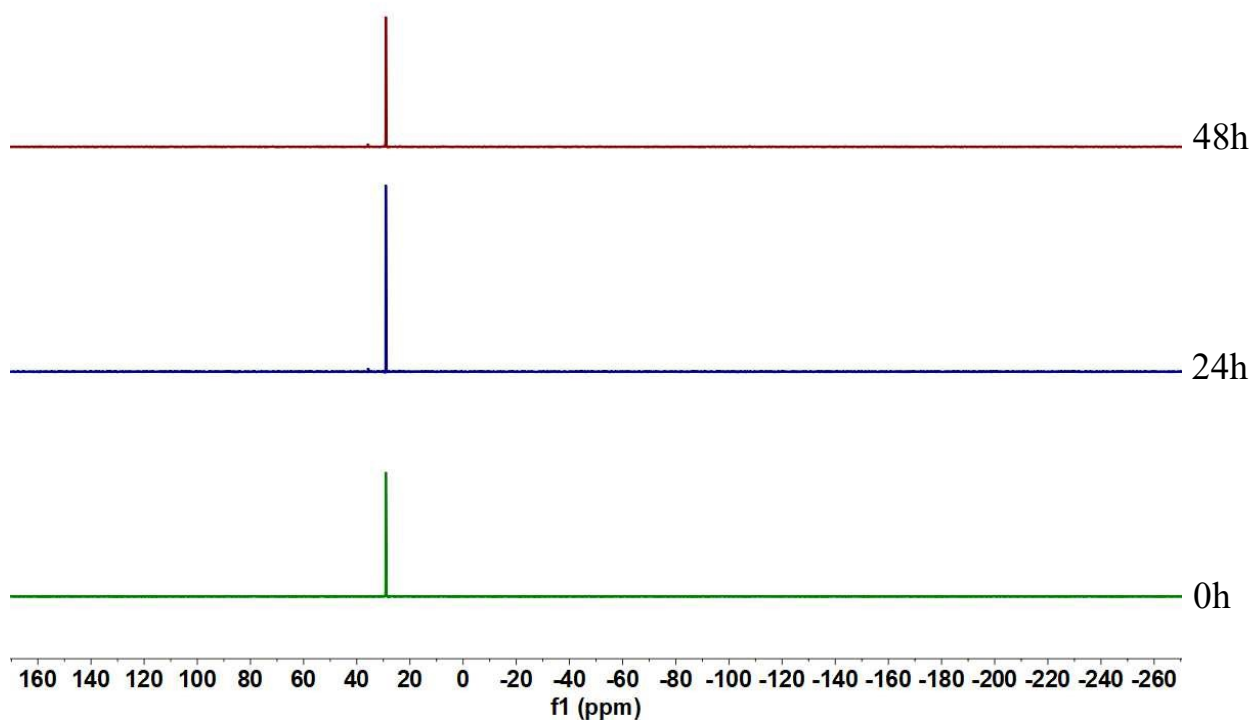


FIGURA 4.26 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PdBr em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48h.

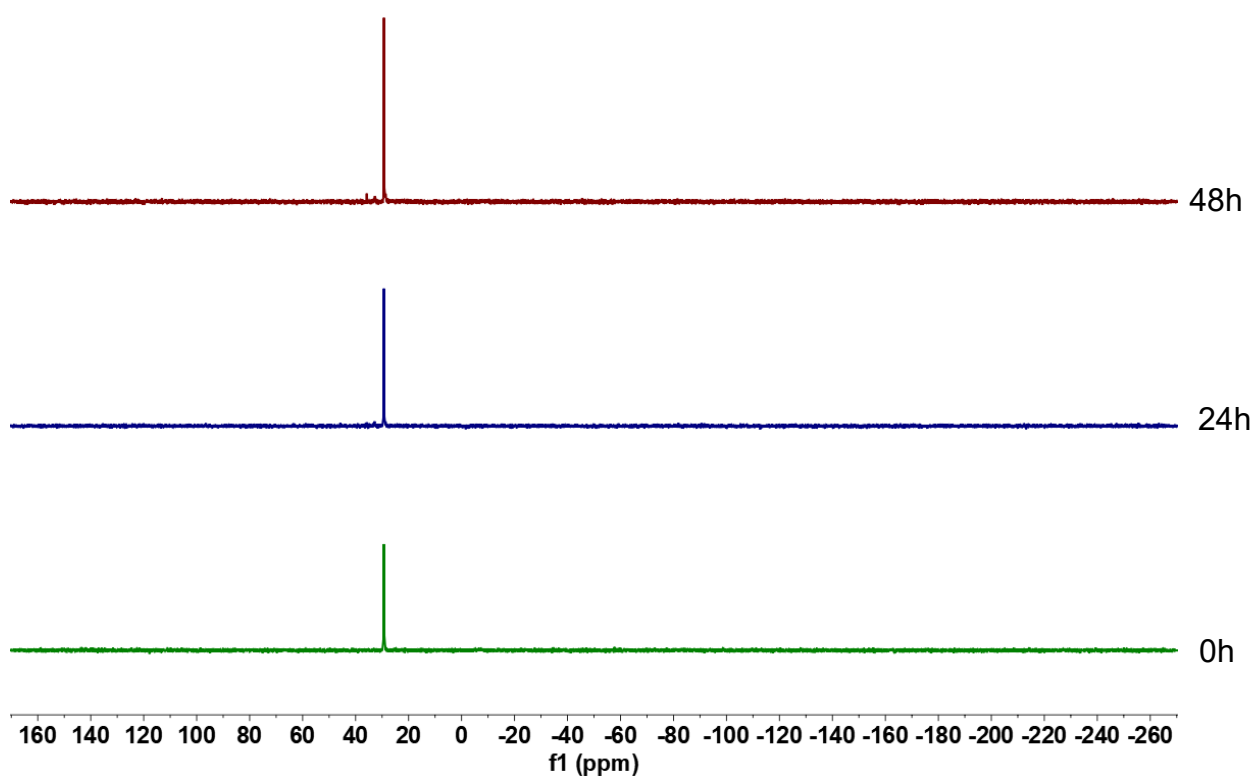


FIGURA 4.27 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PdBr em DMSO-D<sub>2</sub>O/DMEM nos tempos de 0,24 e 48h.

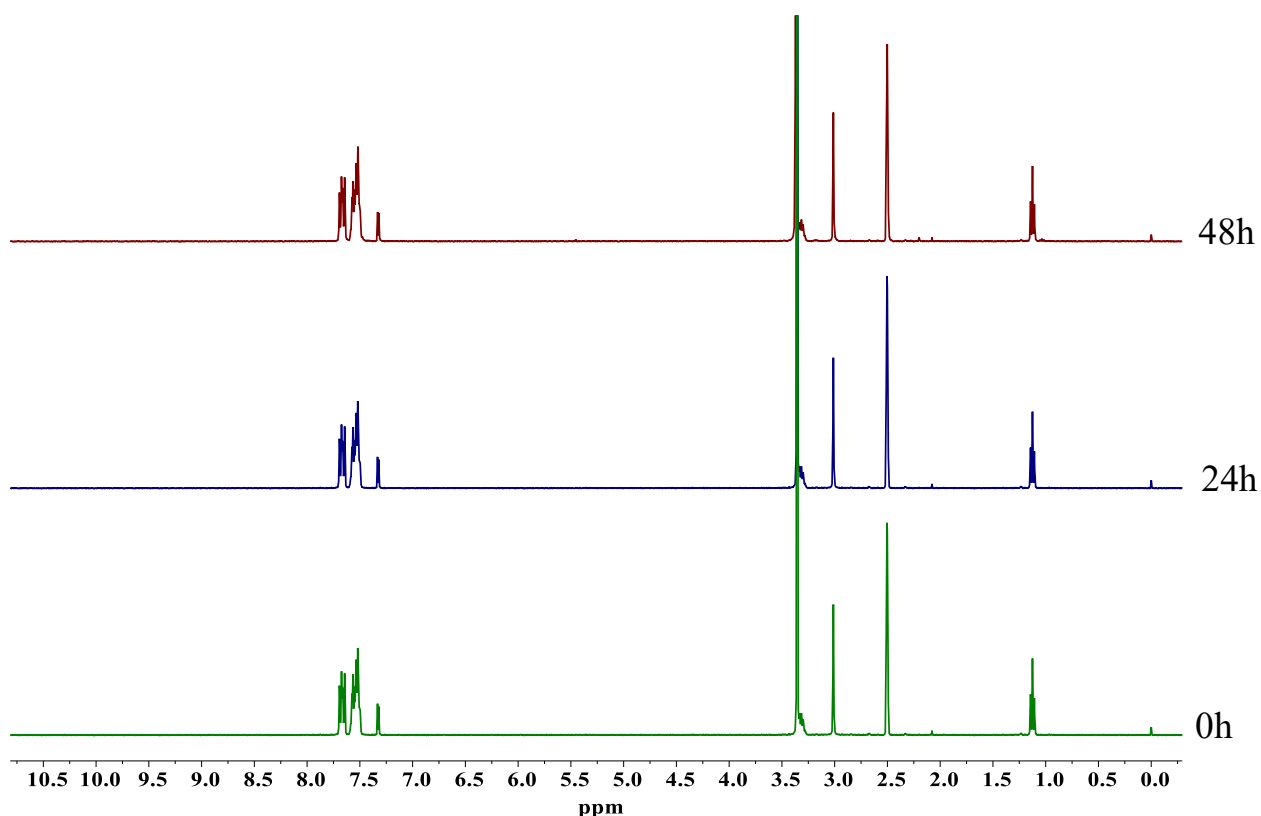


FIGURA 4.28 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo PdBr em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48h.

#### 4.8.2 - Estudo de estabilidade por Ultravioleta-visível em DMSO:

O ensaio de estabilidade também foi realizado pela técnica de Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível a partir de soluções  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  em DMSO, apenas para os ligantes que foram utilizados nas sínteses dos complexos. Os espectros dos ligantes foram registrados em três diferentes momentos 0, 24 e 48h. A Figura 4.29, representa a sobreposição dos espectros obtidos. Por meio desse ensaio foi observado que os ligantes se mantêm estáveis nas condições testadas.

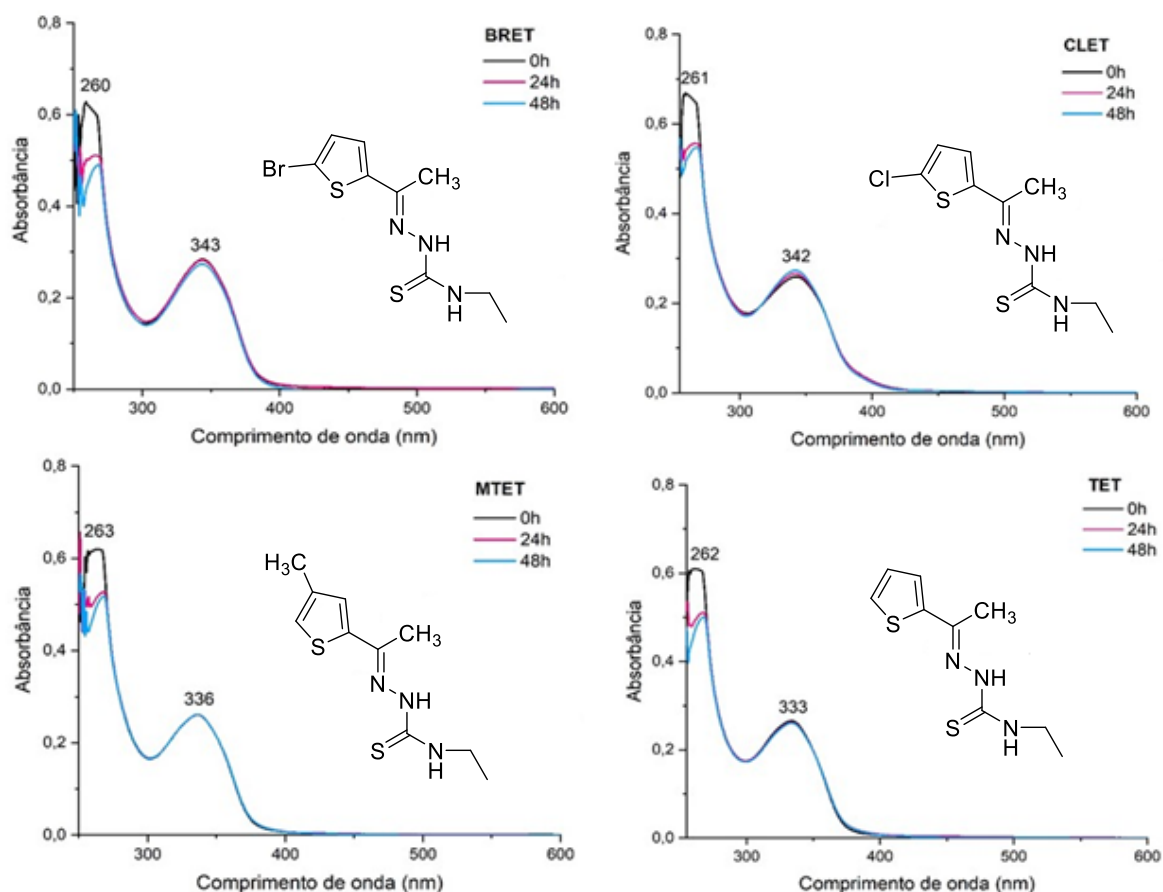


FIGURA 4.29 - Estabilidade das soluções dos ligantes  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48h.

Os complexos também foram submetidos ao estudo de estabilidade em DMSO, e os espectros correspondentes foram registrados no intervalo de tempo de 0 a 72h, a cada 24h. Por meio da sobreposição dos espectros obtidos, foi possível verificar que os complexos de paládio apresentavam uma diminuição da banda em 369 nm e o surgimento de uma banda em torno de 485 nm, conforme demonstrado na Figura 4.30. Uma das hipóteses para justificar tal comportamento seria a labilização do ligante cloreto, já que este é um bom grupo abandonador, seguido da coordenação do DMSO. Já nos compostos análogos de platina não foi observada nenhuma alteração espectral significativa sugerindo uma maior estabilidade em DMSO, o que está de acordo com o perfil cinético dos dois íons metálicos.<sup>20</sup> Adicionalmente, foi registrado o espectro para o complexo PtBr em

clorofórmio, verificando-se que a banda em torno de 500 nm permanecia presente, como pode ser visto na Figura 4.31, confirmando sua atribuição como uma transferência de carga ligante-metal.<sup>56</sup>

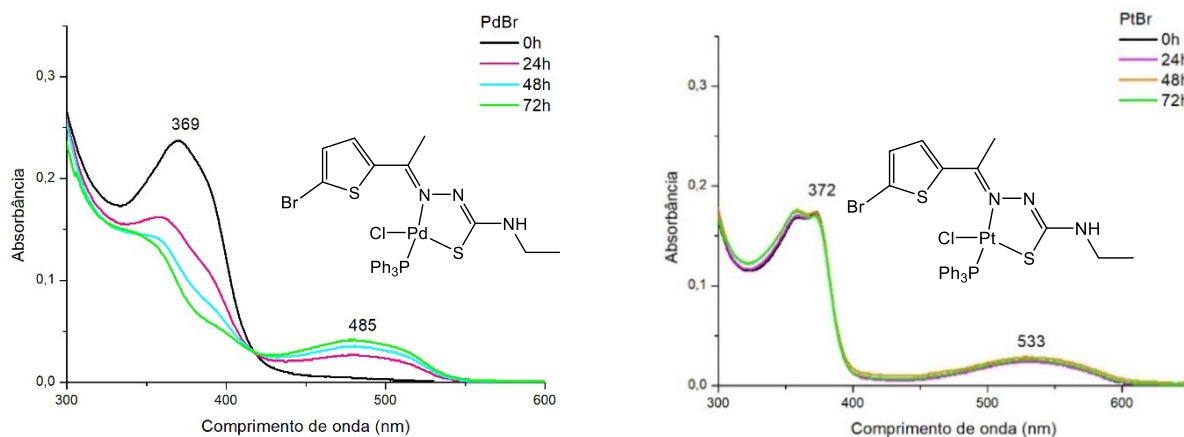


FIGURA 4.30 - Estabilidade das soluções dos complexos  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  em DMSO em 0, 24, 48h e 72h.

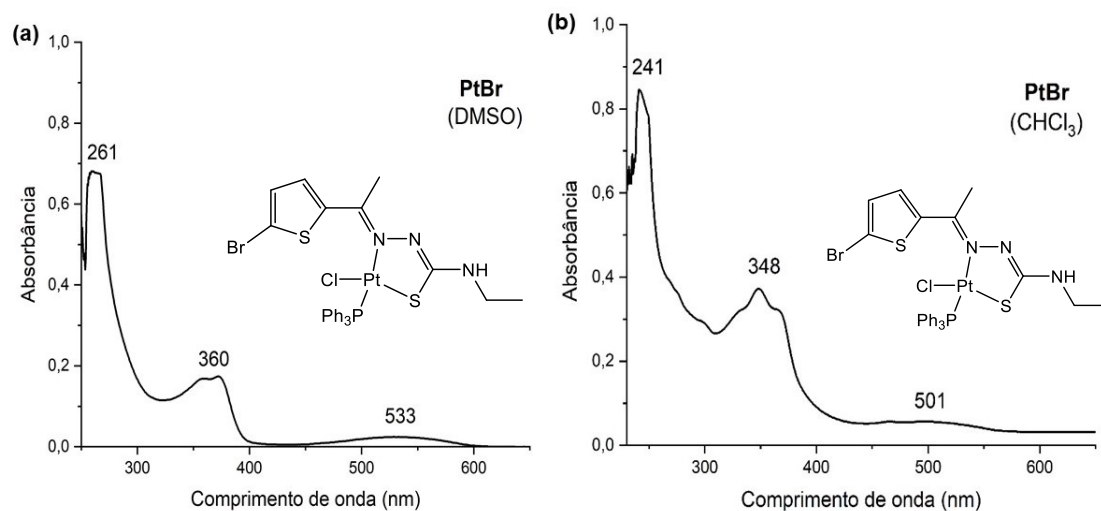


FIGURA 4.31 - Espectros do complexo PtBr na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  em (a) DMSO e (b)  $\text{CHCl}_3$ .

#### 4.8.3- Estudo de estabilidade por UV-Vis em acetona:

Diante dos dados resultantes dos estudos de estabilidade por RMN, onde não foi possível observar mudanças significativas, foi realizado um estudo de estabilidade em outro solvente a partir da técnica espectroscópica de

Ultravioleta-visível. Desta forma, optou-se pela utilização de um solvente com menor capacidade coordenante com o dmsso, como acetona, registrando os espectros até 48h. A partir da sobreposição dos espectros em diferentes tempos foi observado que os complexos se mantêm estáveis, sem nenhuma alteração significativa. Além disso, também foi verificado que não ocorre o surgimento de uma banda na região próxima a 480 nm, como evidenciado nas Figuras 4.32 e 4.33. Desta forma, pode-se inferir que tais modificações observadas em DMSO estão diretamente relacionadas com a natureza do solvente.

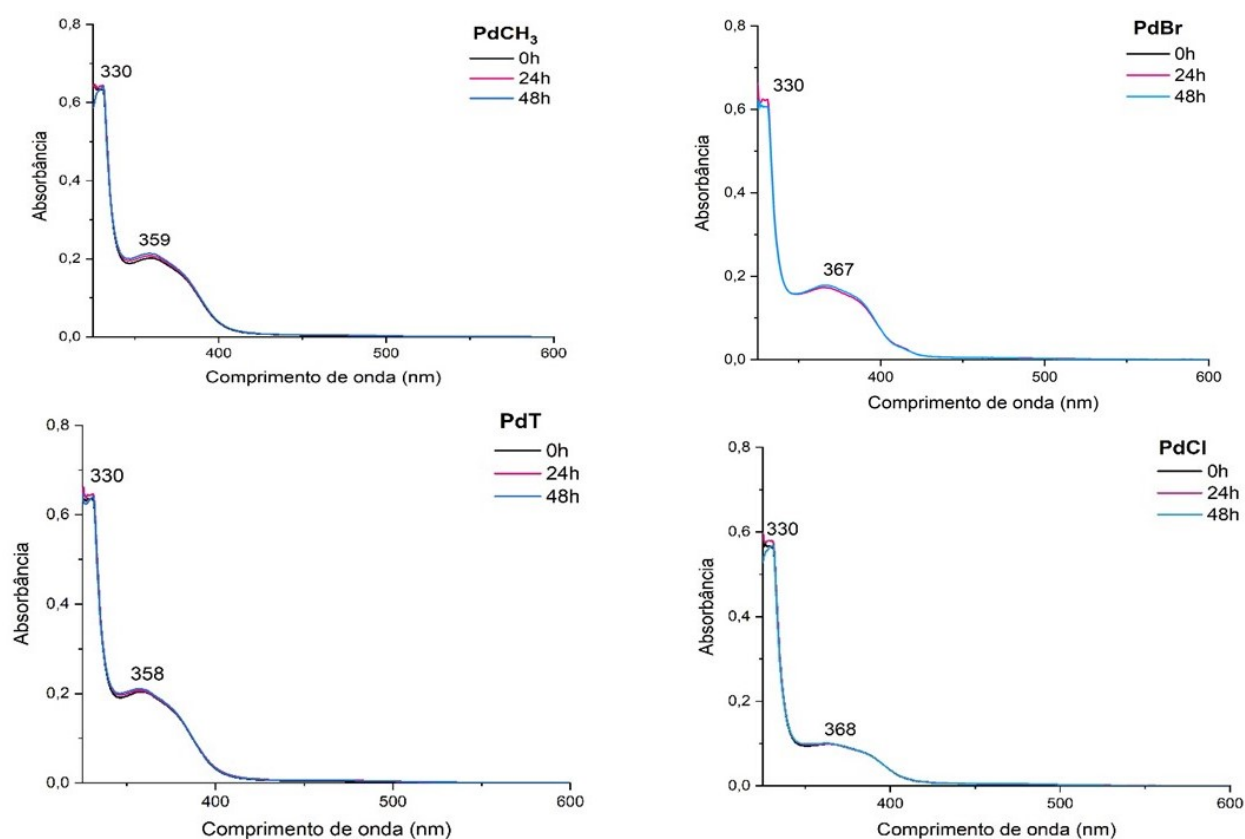


FIGURA 4.32 - Estudo de estabilidade dos complexos de paládio na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  em acetona em 0, 24 e 48h.



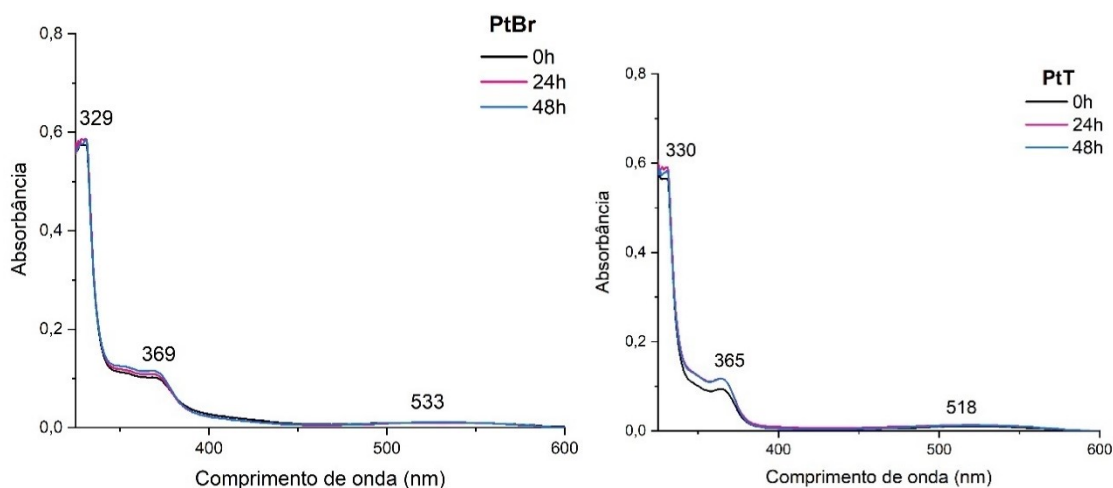


FIGURA 4.33 - Estudo de estabilidade dos complexos de platina na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  em acetona em 0, 24 e 48h.

#### 4.8.4 - Estudo de estabilidade por UV-Vis em DMSO sem luz:

A fim de investigar o que estaria provocando as alterações espectrais observadas no UV-Vis em DMSO, os complexos foram submetidos ao estudo de estabilidade sem a presença de luz em DMSO. A partir do qual foi observado que os complexos se mantiveram estáveis durante 48h nas condições testadas como elucidado pela sobreposição dos espectros na Figura 4.34. Desta forma, não foi verificado a diminuição da banda em torno de 370 nm e nem o surgimento de uma banda em torno de 480 nm como visto no estudo de estabilidade em DMSO quando as soluções das amostras não eram protegidas da luz.

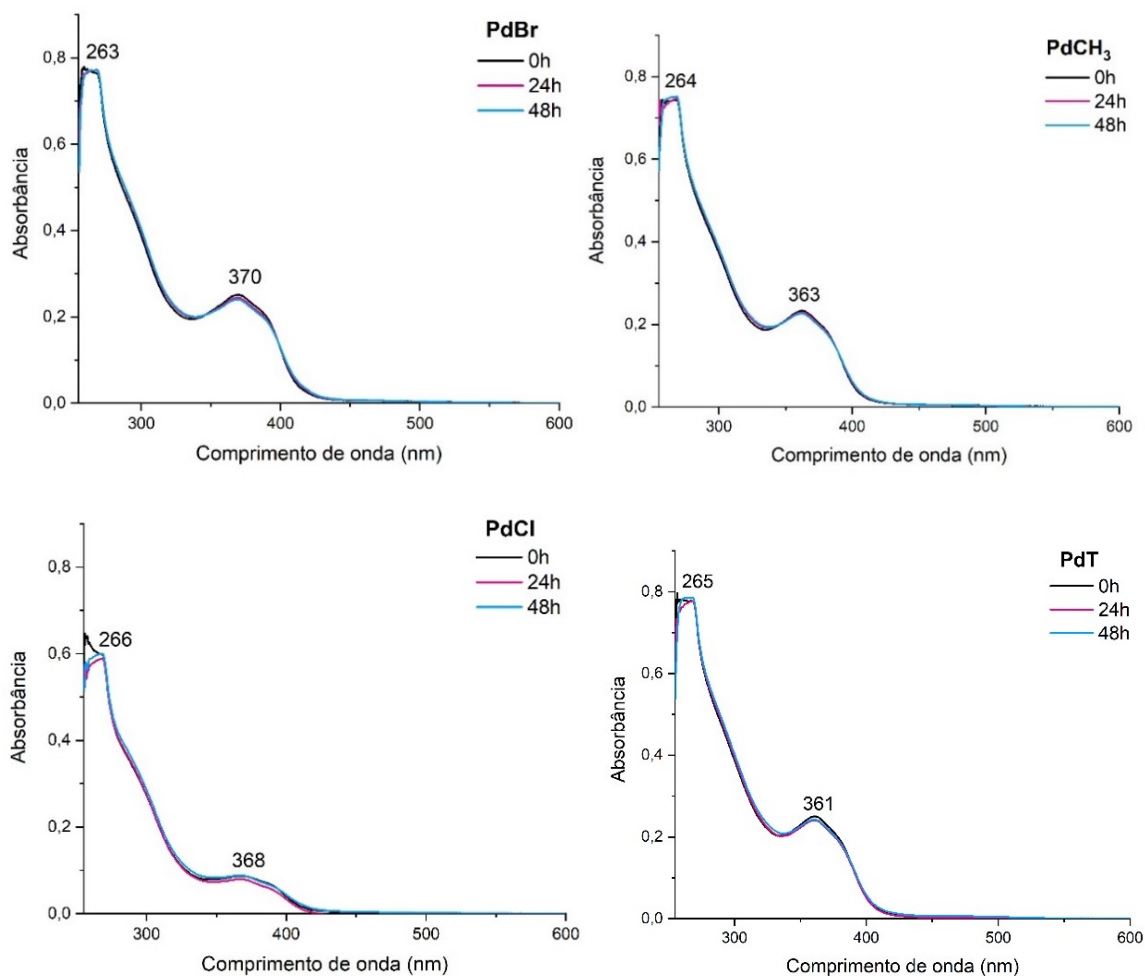


FIGURA 4.34 - Estudo de estabilidade dos complexos na concentração  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  em DMSO sem luz em 0, 24 e 48h.

A partir desse estudo de estabilidade é possível inferir que as modificações observadas anteriormente nos espectros de Ultravioleta-visível não são decorrentes da labilização do ligante cloreto quando solubilizados em DMSO, uma vez que era esperado o mesmo comportamento quando as soluções fossem protegidas da luz. Esses resultados ainda são reforçados pelos dados provenientes do estudo de estabilidade por condutividade molar na presença de luz.

Os dados resultantes sugerem que as alterações espectrais observadas anteriormente são, provavelmente, provenientes de uma modificação conformacional, desencadeada pela luz e natureza do solvente, e não estrutural. Comportamento semelhante foi descrito por Hirade e colaboradores em 2013, no qual foi relatado a rotação da ligação C-N com incidência de luz UV.<sup>117</sup>

#### 4.8.5 - Estudo de estabilidade por Condutividade molar em DMSO:

Os dados referentes as medidas de condutividade em dependência do tempo estão dispostas na Tabela 4.10. Os resultados sugerem que os complexos de paládio e PtBr se mantêm neutros durante 48h como consequência da coordenação do ligante na forma aniônica, e mais, que mantêm o cloro na esfera de coordenação. Os dados resultantes reforçam a sugestão de que, provavelmente, as modificações espectrais observadas em DMSO não estariam relacionadas com a saída do grupo cloreto e subsequente entrada do DMSO. O composto PtT, também manteve sua natureza eletrolítica 1:1 estável.<sup>98</sup>

TABELA 4.10 - Medidas de condutividade para os complexos na concentração de  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  em DMSO no intervalo de tempo de 0 a 48h.

Condutividade molar			
Complexos	0h	24h	48h
PdCl	2,8	6,69	6,54
PdBr	2,36	6,53	6,52
PdT	2,85	5,55	6,07
PdCH <sub>3</sub>	2,46	3,76	3,81
PtBr	6,97	13,56	9,57
PtT	46,41	52,75	36,70

#### 4.9 - Síntese dos complexos em DMSO:

Com a finalidade de verificar se as alterações espectrais em DMSO estavam relacionadas com a coordenação do solvente, foi realizada a síntese dos complexos PdT e seu análogo PtT em DMSO. Nesse contexto, o espectro de RMN <sup>31</sup>P em CDCl<sub>3</sub> representado na Figura 4.35 apresentou dois sinais, no qual o sinal mais pronunciado em 27,82 ppm, provavelmente, seja proveniente do composto com DMSO coordenado, conforme o desejado. No entanto, o espectro também apresenta outro sinal, menos pronunciado, em 28,03 ppm, o qual coincide com o sinal em 28,05 ppm corresponde ao produto PdT contendo o íon cloreto em sua

esfera de coordenação (Figura 4.36). A presença de ambos os sinais sugere que não houve a completa conversão no produto contendo DMSO na esfera de coordenação como o esperado, mesmo com a adição de  $\text{AgNO}_3$  durante a síntese.

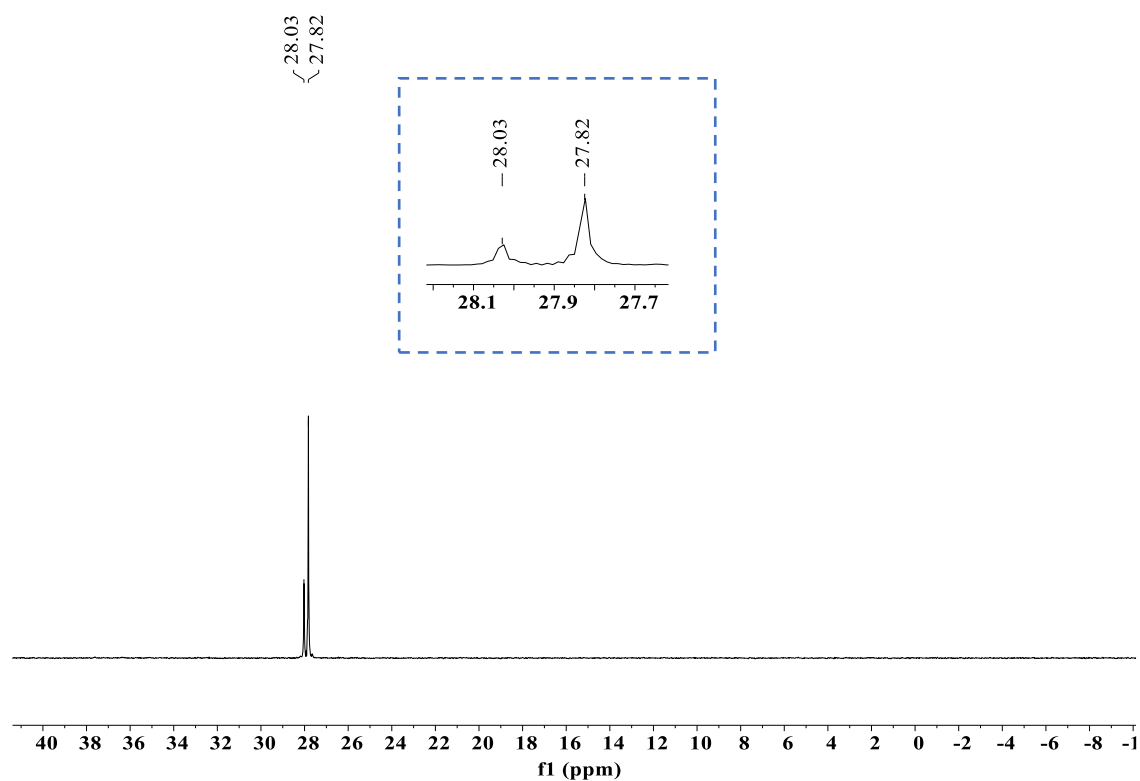


FIGURA 4.35 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  em  $\text{CDCl}_3$  do complexo PdT(DMSO).

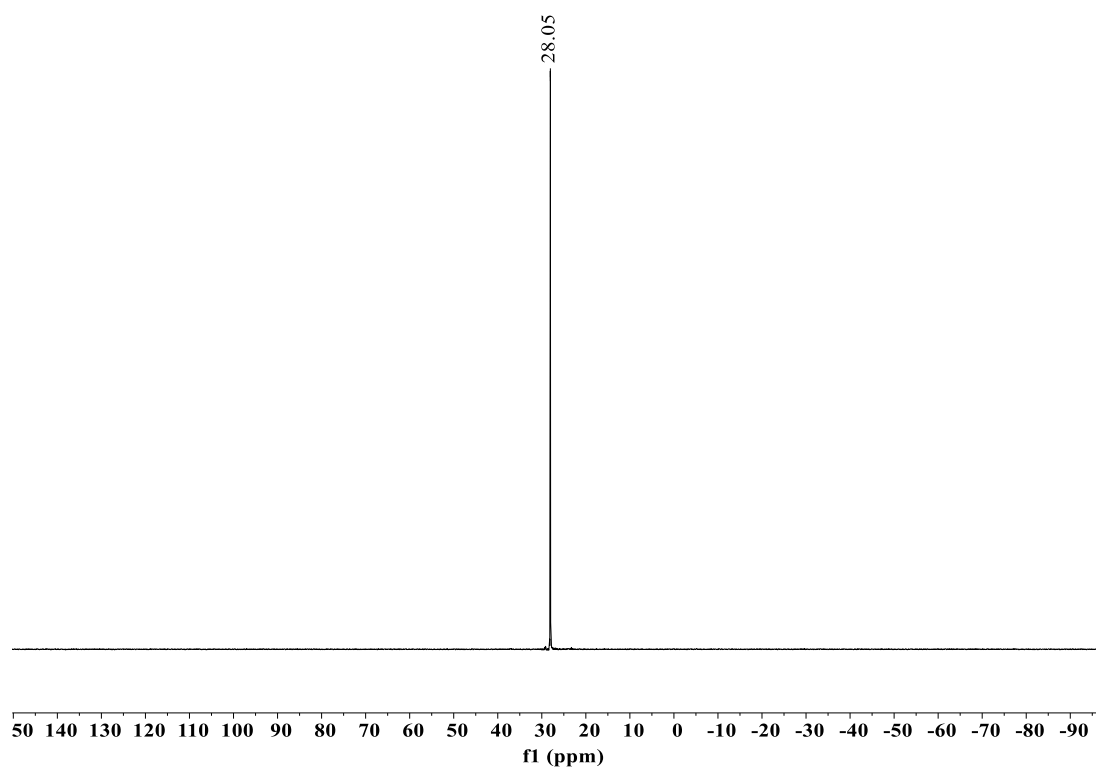


FIGURA 4.36 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  em  $\text{CDCl}_3$  do complexo PdT.

O mesmo comportamento pode ser visto para o complexo análogo de platina PtT(DMSO), cujo espectro encontra-se elucidado na Figura 4.37. Foi possível observar a presença de um sinal mais intenso em torno de 15,01 ppm e sinais menos intensos de difícil atribuição, uma vez que se encontram sobrepostos ao sinal do ruído, os quais não estão presentes no espectro do complexo PtT representado na Figura 4.38. Desta forma, possivelmente os novos sinais estejam relacionados com a obtenção do produto com DMSO coordenado, porém, esse é obtido em menor proporção, o que está de acordo com a conservação estrutural obtida para o complexo de platina no estudo de estabilidade via UV-vis, e com sua natureza mais inerte em relação ao centro metálico de paládio.

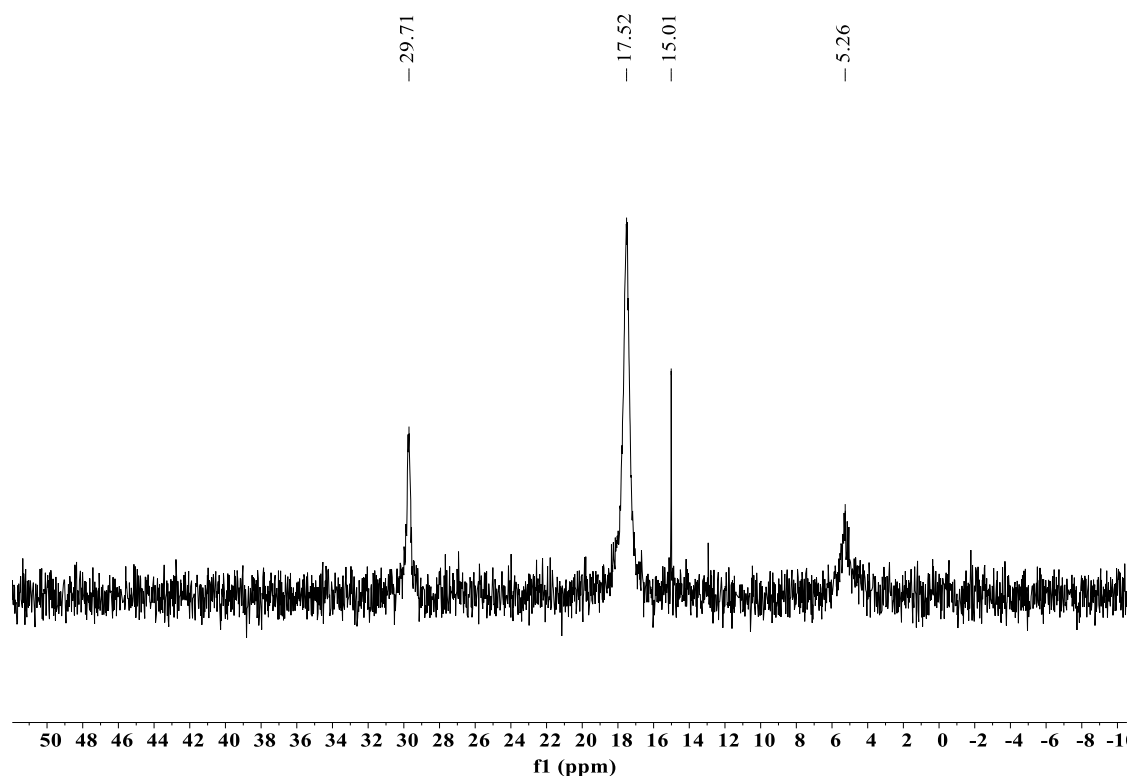


FIGURA 4.37 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  em  $\text{CDCl}_3$  do complexo PtT(DMSO).

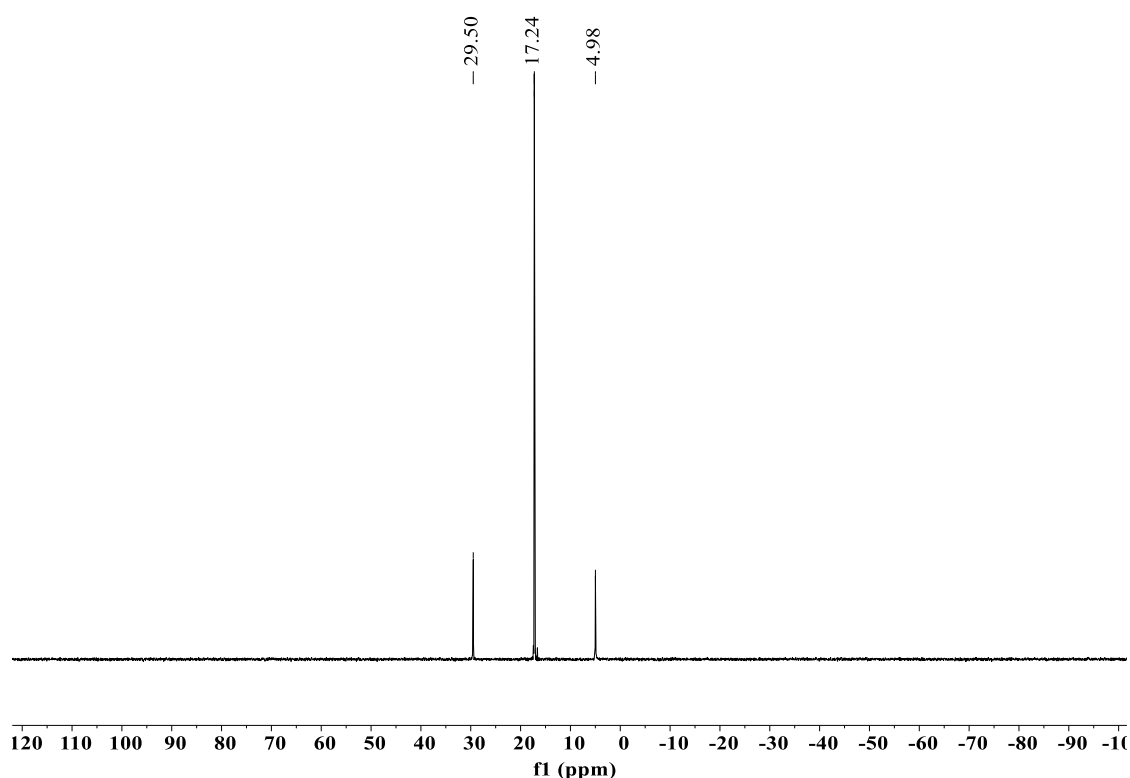


FIGURA 4.38 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  em  $\text{CDCl}_3$  do complexo PtT.

## 4.10 - Estudo de interação com DNA

### 4.10.1 - Titulação Espectroscópica:

A espectroscopia eletrônica de absorção é normalmente usada para verificar a existência de possíveis interações entre o DNA e complexos de interesse. Compostos capazes de interagir com a biomolécula acarretam alterações espectroscópicas significativas, tanto na banda do DNA quanto nas bandas dos complexos.<sup>118</sup>

Nesse contexto, foi realizado o monitoramento da banda de maior absorvidade molar do complexo, à medida que adições consecutivas de ct-DNA foram realizadas. Após análise dos dados foi possível obter valores de constante de ligação intrínseca ( $K_b$ ) na ordem de  $10^4$  a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . A única exceção foi o composto PtBr, o qual não apresentou modificações significativas nos espectros durante as adições de DNA, e por isso não foi possível calcular um valor de  $K_b$ . De acordo com a literatura, os sistemas intercaladores como o Brometo de Etídeo

exibem valores de  $K_b$  entre  $10^5$  a  $10^7$   $M^{-1}$ , enquanto que interações via sulcos abrangem a ordem de grandeza entre  $10^3$  a  $10^4$   $M^{-1}$ .<sup>119,120</sup>

Os valores de constante de ligação encontrados e descritos na Tabela 4.11, sugerem que a interação, nas concentrações testadas, entre o ct-DNA e os complexos ocorram por meio de ligações via sulco do DNA, e/ou por interações eletrostáticas clássicas e não clássicas, tais como: ligações de hidrogênio e/ou forças de Van der Waals. As mudanças espectroscópicas reforçam essa hipótese, uma vez que a intercalação é caracterizada por deslocamento batocrômico, entre 10-15 nm, e um elevado hipocromismo, na faixa de 35-50%. Ambos os efeitos são decorrentes das interações  $\pi$ - $\pi$  estabelecidas entre os complexos e as bases do DNA.<sup>121,124</sup> No entanto, os espectros de titulação espectrométrica, mostram pequeno ou nenhum deslocamento para o vermelho e uma diminuição de intensidade da absorvidade molar da banda analisada não tão intensa como pode ser visto na Figura 4.39. Os valores de  $K_b$  resultantes estão próximos aos encontrados na literatura para compostos derivados de tiossemicarbazonas.<sup>120,121</sup>

TABELA 4.11 - Valores de constante intrínseca ( $K_b$ ) para os complexos.

Complexo	$K_b$ (mol. L <sup>-1</sup> )	Hipo (%)
PdBr	$1,08 \times 10^5$	18
PdCl	$2,93 \times 10^4$	26,1
PdCH <sub>3</sub>	$2,03 \times 10^5$	21,6
PdT	$1,55 \times 10^5$	14
PtBr	-	0,6
PtT	$4,96 \times 10^4$	21,8
B.E*	$1 \times 10^6$	-

\*B.E: Brometo de Etídeo

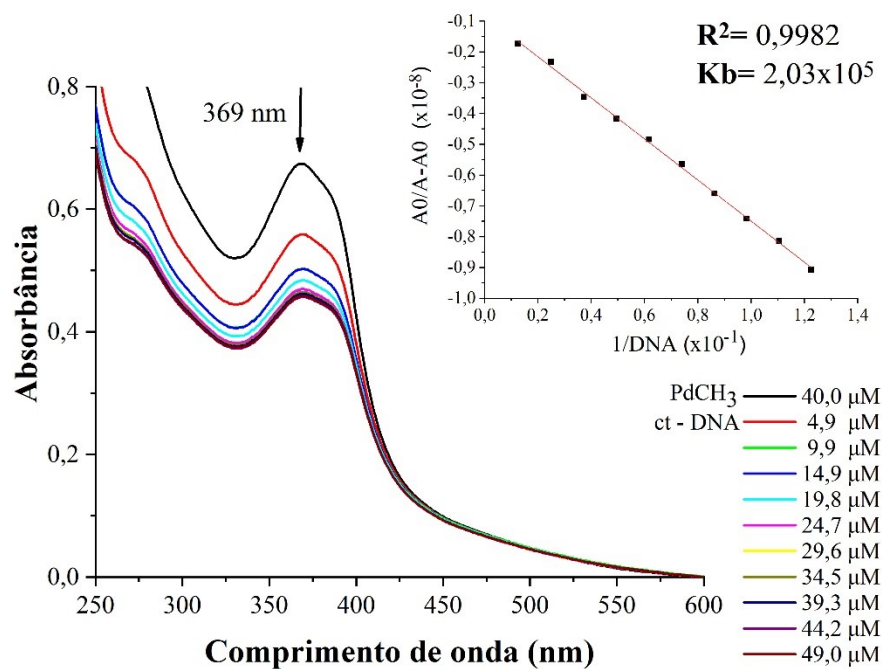


FIGURA 4.39 - Interação do complexo PdCH<sub>3</sub> com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração 40 μM do complexo PdCH<sub>3</sub> se manteve fixa e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,9 a 49,0 μM).

Comparativamente, o composto PdCH<sub>3</sub> exibe o maior valor de K<sub>b</sub>, indicando maior afinidade pelo DNA. Já para os complexos de platina não foram observadas alterações significativas em suas bandas e, portanto, nenhum efeito pronunciado foi evidenciado como representado na Figura 4.40. A partir de tal observação é possível inferir que estes apresentem uma menor afinidade pelo DNA quando comparado com seus análogos de paládio ou não interagem como no caso do complexo PtBr.



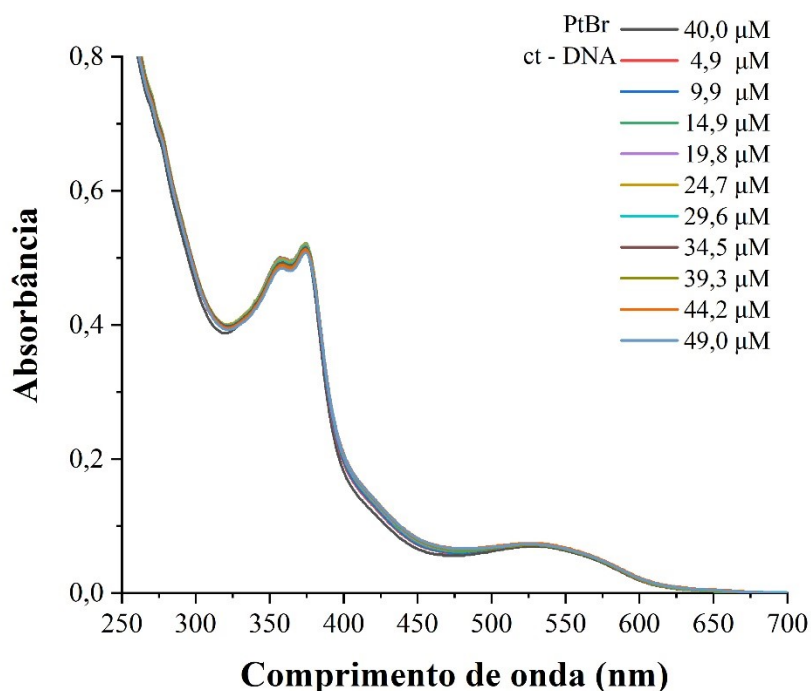


FIGURA 4.40 - Interação do complexo PtBr com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração 40 μM do complexo PtBr se manteve fixa e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,9 a 49 μM).

#### 4.10.2 - Eletroforese em gel de agarose:

A interação dos complexos com o DNA também foi investigada usando a técnica de eletroforese em gel de agarose. Essa técnica é amplamente usada com a finalidade de extrair, purificar e identificar macromoléculas, tais como o DNA e proteínas. Pois, a partir da aplicação de um campo elétrico sob a matriz porosa de um gel, é possível realizar a separação de partículas carregadas por meio da diferença de mobilidade eletroforética. A separação das partículas se procede considerando a força de atrito, a qual dificulta a movimentação na rede de poros do gel. A taxa de migração de DNA através do gel depende de vários fatores como o seu comprimento e sua conformação. O DNA se move no campo elétrico como um ânion, devido à sua carga negativa inerente, migrando do cátodo para o ânodo.<sup>64</sup> Desta forma, partículas de menor tamanho como a forma

supernovelada do DNA migram mais facilmente e rapidamente pelo gel, enquanto as partículas maiores como a forma relaxada do DNA tendem a migrar mais lentamente devido a sua forma e tamanho, conseqüentemente, ficando por mais tempo retidas no gel. Essa mudança conformacional do DNA pode ser provocada pela sua interação com possíveis agentes antineoplásicos, as quais podem ser de natureza covalente ou intercalativa.<sup>122,123</sup> Nessa técnica, normalmente é usado como marcador de DNA o brometo de etídeo, o qual interage com o plasmídeo via modo intercalativo. O aduto formado DNA-brometo de etídeo possibilita a marcação e visualização das bandas no gel por fotodocumentação.<sup>123</sup>

Nesse contexto, a partir dos dados resultantes dessa técnica verificou-se que os compostos não foram capazes de interagir com o DNA nas concentrações mais baixas que variaram entre 0,1 -10 uM. Desta forma, as bandas dos compostos exibiram o mesmo padrão eletroforético observado no controle negativo, o qual é constituído somente por DNA, conforme representado na Figura 4.41.

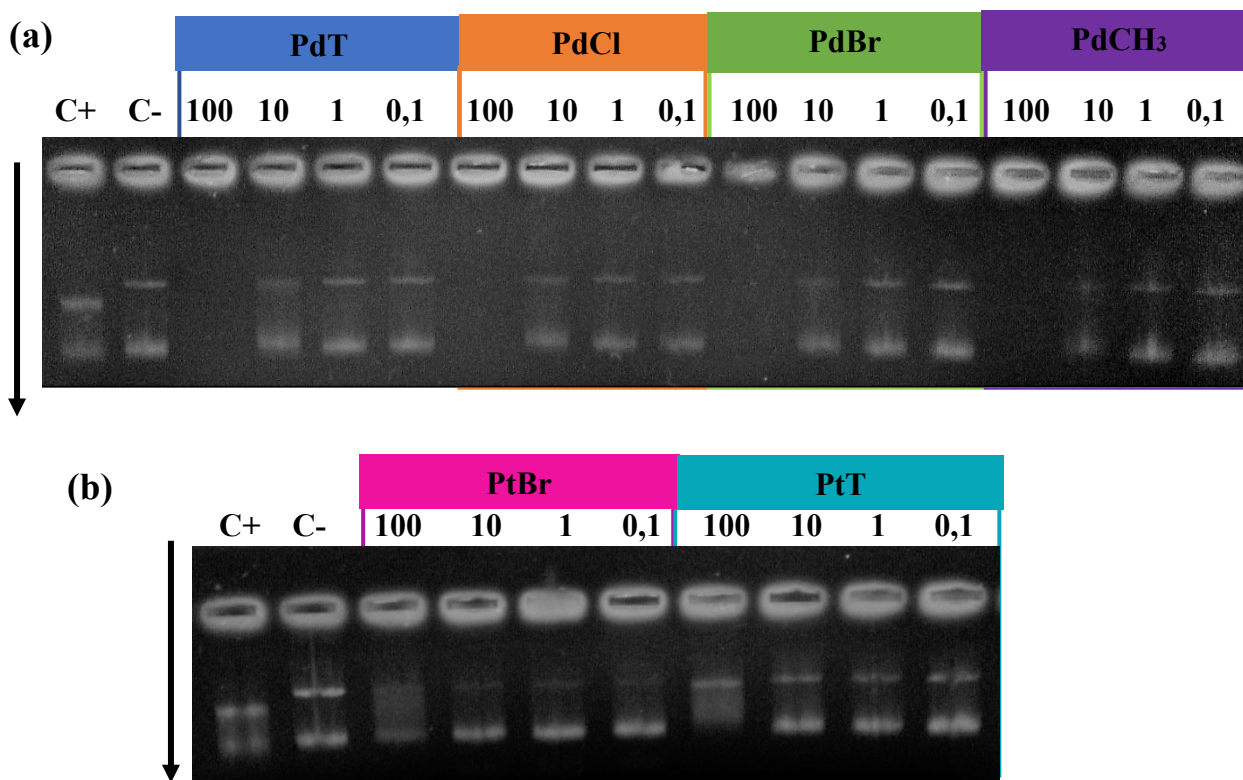


FIGURA 4.41 - Interação dos complexos com ct-DNA por Eletroforese em gel. (a) C+ (Linha 1): água, cisplatina e DNA, C- (Linha 2): água e DNA. Linha 3: PdT (100  $\mu$ M), Linha 4: PdT (10  $\mu$ M), Linha 5: PdT (1  $\mu$ M), Linha 6: PdT (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PdCl (100  $\mu$ M), Linha 8: PdCl (10  $\mu$ M), Linha 9: PdCl (1  $\mu$ M), Linha 10: PdCl (0,1  $\mu$ M). Linha 11: PdBr (100  $\mu$ M), Linha 12: PdBr (10  $\mu$ M), Linha 13: PdBr (1  $\mu$ M), Linha 14: PdBr (0,1  $\mu$ M). Linha 15: PdCH<sub>3</sub> (100  $\mu$ M), Linha 16: PdCH<sub>3</sub> (10  $\mu$ M), Linha 17: PdCH<sub>3</sub> (1  $\mu$ M), Linha 18: PdCH<sub>3</sub> (0,1  $\mu$ M). (b) C+ (Linha 1): água, cisplatina e DNA, C- (Linha 2): água e DNA. Linha 3: PtBr (100  $\mu$ M), Linha 4: PtBr (10  $\mu$ M), Linha 5: PtBr (1  $\mu$ M), Linha 6: PtBr (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PtT (100  $\mu$ M), Linha 8: PtT (10  $\mu$ M), Linha 9: PtT (1  $\mu$ M), Linha 10: PtT (0,1  $\mu$ M).

Já na concentração maior de 100  $\mu$ M, para os complexos de paládio não foi possível identificar nenhuma das formas do plasmídeo. De acordo com a literatura, esse comportamento poderia estar relacionado a aglomeração dos compostos ao DNA, o que impediria sua marcação com o intercalador brometo de etídeo. Outra possibilidade que poderia estar associada com o desaparecimento das bandas se refere a clivagem do DNA pelo complexo, devido a sua alta concentração e os fragmentos resultantes apresentariam alta mobilidade

eletroforética devido ao seu pequeno tamanho. Essa clivagem provocaria a migração destes fragmentos por todo o gel de agarose, levando ao desaparecimento das bandas do plasmídeo após a corrida eletroforética.<sup>125</sup>

A primeira possibilidade é a mais condizente com os dados obtidos pela titulação espectroscópica, uma vez que não se observou interações que evidenciam um alto nível de interação. Além disso, a interação via sulcos do DNA pode afetar o plasmídeo de forma que o corante utilizado não marque a molécula danificada ou que essas interações eletrostáticas em altas concentrações não permitam que o plasmídeo se movimente pelo gel, devido sua alta densidade.<sup>125,126,127</sup> Adicionalmente, é reportado na literatura que alguns compostos que interagem com o DNA via sulcos podem deslocar compostos intercaladores, como o brometo de etídio.<sup>128</sup> No entanto, mais ensaios foram necessários para se determinar de forma efetiva o tipo de interação.

Já para os complexos de platina em alta concentração de 100 uM foi verificado que o complexo PtBr apresentou o mesmo padrão eletroforético do controle negativo (DNA) indicando que este composto não interage com o DNA, o que está condizente com a titulação espectroscópica, onde não foi possível calcular um valor de Kb. Já para o complexo PtT foi observado o desaparecimento da banda referente a forma superenovelada do DNA, assim verificando a presença da banda referente a forma relaxada do plasmídeo, o que sugere uma modificação na conformação estrutural do DNA como consequência da interação com o complexo. No entanto, o padrão eletroforético é diferente daquele observado para o controle positivo, constituído pelo DNA e cisplatina, sugerindo um modo de interação não covalente, como exibido pela droga padrão. Em suma, tais resultados sugerem que o complexo de platina PtT e os demais complexos de paládio são capazes de interagir com o DNA somente em altas concentrações.

### 4.10.3 - Dicroísmo Circular (CD):

Para avaliar a influência dos complexos em possíveis mudanças estruturais em moléculas quirais como o DNA utilizou-se a técnica espectroscópica de Dicroísmo Circular. A grande parte dos compostos que são capazes de se ligar ao DNA são aquirais e opticamente inativos. Porém, esses podem provocar mudanças em comprimentos de onda específicos no espectro UV onde o DNA normalmente absorve, na região em torno de 200-320 nm, assim sendo possível identificar interações composto-DNA com extrema sensibilidade.<sup>64,129</sup> O espectro de CD da dupla hélice na forma B do DNA consiste em duas bandas: uma positiva (275 nm) referente ao empilhamento  $\pi$ - $\pi^*$  das nucleobases e uma negativa (245 nm) atribuída à estabilização da forma B do DNA. Desta forma, após uma incubação DNA-composto de interesse, mudanças observadas nas bandas características do DNA no espectro de CD correspondem a alterações em sua estrutura em decorrência de interações significativas com o composto de estudo.<sup>130</sup> Os complexos PdT e PdCl foram escolhidos para a realização deste ensaio para fim comparativo, pois o complexo PdCl foi o que interagiu de forma menos efetiva com o DNA, enquanto o complexo PdT apresentou o maior valor de Kb.

Compostos que interagem de forma intercalativa com o DNA promovem alterações espectrais capazes de perturbarem o perfil espectral da estrutura do DNA e normalmente provoca o aumento do sinal de ambas as bandas.<sup>64</sup> Uma vez que a inserção dos compostos entre os pares das bases da biomolécula promove uma reorganização do empilhamento pré-existente, provocando modificações conformacionais.<sup>62</sup> Em contraponto, as interações de caráter eletrostático ou hidrofóbico nos sulcos não são capazes de alterar o espectro ou provocam, apenas, pequenas mudanças.<sup>131,132,133</sup> As ligações via sulcos menores normalmente causam uma diminuição no sinal associado a interações de ligação de hidrogênio (220 nm).<sup>64</sup> Desse modo, a partir dos dados

resultantes de CD para os complexos não foi possível observar alterações significativas no perfil das bandas de DNA (Figuras 4.42 e 4.43), nas condições testadas. Esses dados corroboram com a magnitude da constante de ligação para os complexos PdT e PdCl, isto é,  $K_b = 1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  e  $2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, reforçam a hipótese de interação via sulco entre o composto e o ct-DNA. Analogamente, como os demais compostos exibiram valores próximos de constante intrínseca de ligação é esperado um comportamento semelhante, no qual consiste em interação via sulco e/ou eletrostática com o DNA.

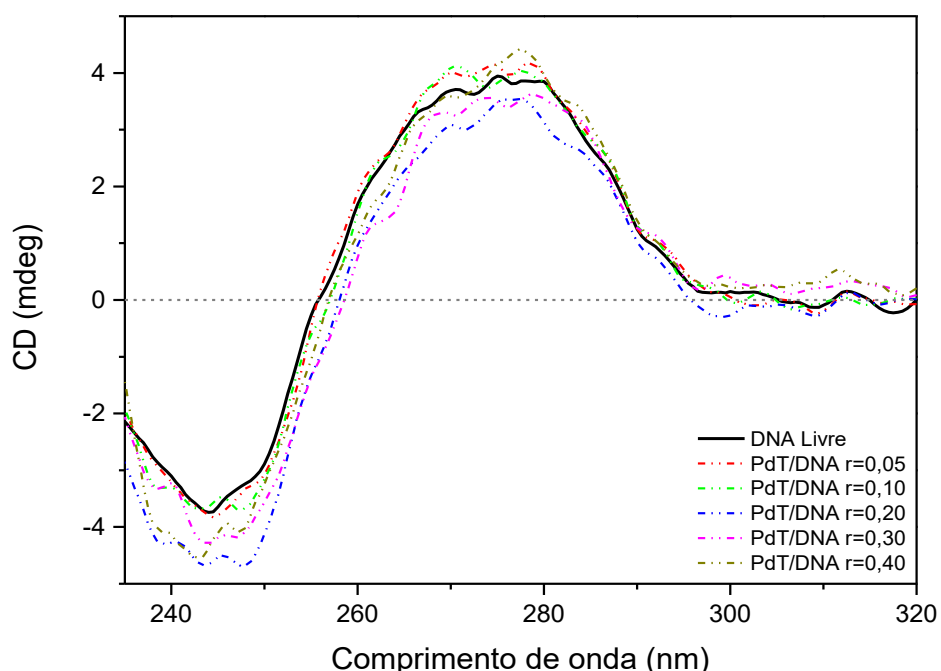


FIGURA 4.42 - Espectros de CD obtidos a partir de adições de concentrações crescentes dos complexos PdT em DMSO nas concentrações de 0 a  $2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  (razão complexo/DNA de 0 a 0,4) na solução do DNA em tampão Tris-HCl de concentração fixa de  $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

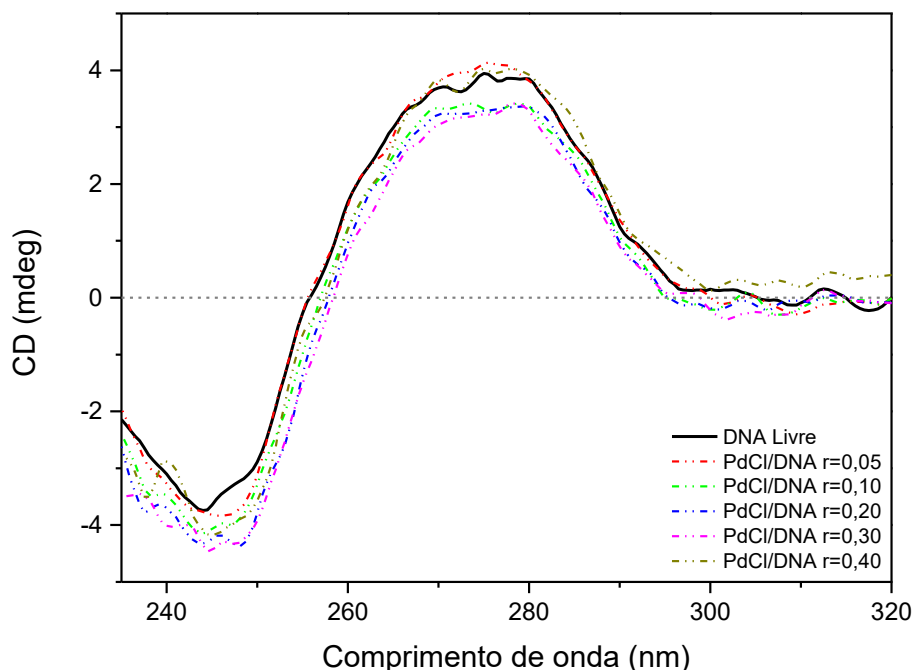


FIGURA 4.43 - Espectros de CD obtidos a partir de adições de concentrações crescentes dos complexos PdCl em DMSO nas concentrações de 0 a  $2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  (razão complexo/DNA de 0 a 0,4) na solução do DNA em tampão Tris-HCl de concentração fixa de  $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

#### 4.10.4 - Estudo de Interação com DNA-Viscosidade

A viscosidade é um método direto que fornece informações sobre as interações composto-DNA por meio de alterações hidrodinâmicas induzidas pelo agente de ligação. A técnica é sensível a alterações no comprimento da cadeia de DNA, as quais permitem identificar os modos de ligação de forma eficaz, uma vez que estes apresentam diferentes características hidrodinâmicas.<sup>64</sup> Diante disso, a influência de diferentes concentrações dos complexos na viscosidade do DNA foi explorada com a finalidade de verificar a natureza de interação entre estes. O composto laranja de tiazol foi usado como padrão, o qual interage com a biomolécula via modo intercalativo o que gera um aumento do comprimento do DNA e conseqüentemente proporciona um aumento em sua viscosidade, conforme observado na Figura 4.44.<sup>135</sup>

De acordo com a literatura, compostos que interagem com o DNA de forma covalente provocam uma diminuição da viscosidade, uma vez que desencadeiam uma distorção da dupla hélice da molécula e causa uma redução no seu comprimento, tal comportamento é evidenciado pela cisplatina.<sup>9</sup> Já em interações do tipo eletrostática e/ou sulco são caracterizadas por não promoverem mudanças significativas na viscosidade do DNA, pois os compostos nesse tipo de interação não são capazes de modificar o comprimento da molécula.<sup>62</sup>

Frente ao exposto, é possível inferir que o complexo PdT, o qual encontra-se entre os complexos que apresentaram um valor de interação intrínseca com o DNA correspondente a uma interação mais efetiva quando comparado com os demais compostos, não provocou alterações significativas na viscosidade do DNA. Esse resultado corrobora com os anteriores provenientes da técnica de Dicroísmo circular sugerindo que os compostos em estudo interagem de forma eletrostática e via sulco com o DNA.

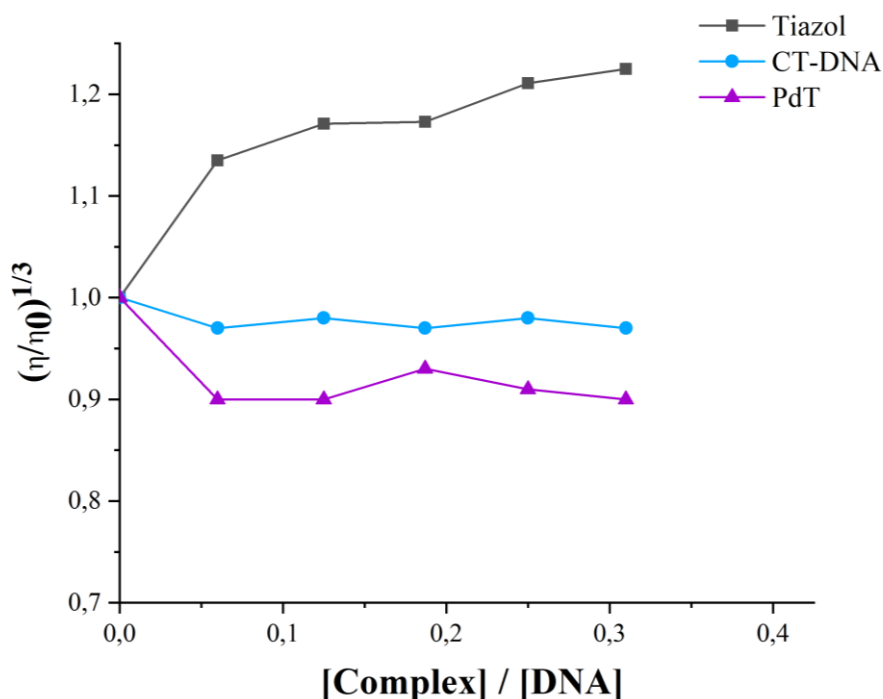


FIGURA 4.44 - Efeito do complexo PdT na viscosidade relativa do DNA comparado com o padrão Tiazol e o DNA livre. Espectro obtido a partir de diferentes relações DNA em tampão Tris-HCl/complexo em DMSO (10%).



#### **4.10.5 - Ensaio competitivo com Hoeschst 33258:**

As análises anteriores sugeriram que os compostos interagem via sulco no DNA e isso instigou a realização do ensaio competitivo com Hoeschst 33258. Sabe-se que esse composto interage no sulco menor do DNA, aumentando sua fluorescência em, aproximadamente, 30 vezes.<sup>134</sup> Por esse motivo, Hoeschst 33258 é geralmente usado como uma sonda de ligação ao sulco menor do DNA, e ensaios de competição podem ser propostos para avaliar se um composto de interesse é capaz de atuar nesse sítio de ligação.

O ensaio consiste em adições sucessivas de alíquotas dos compostos de interesse em uma solução contendo o aduto DNA-corante com concentração fixa. Os compostos capazes de interagirem no sulco menor do DNA provocam perturbações que diminuem a efetividade da interação com o Hoeschst 33258, o que conseqüentemente, acarreta uma diminuição da fluorescência. Tal comportamento é observado para os complexos PdT e PdCl, cujos espectros estão representados nas Figuras 4.45 e 4.46, respectivamente. A partir dos mesmos é observado que não ocorre uma completa extinção da fluorescência, o que significa que o composto não foi capaz de deslocar o Hoeschst 33258, o que está de acordo com o Kb exibido para os compostos, os quais são menores quando comparado com o do corante ( $K_b = 4,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) indicando que os compostos tendem a interagir mais fracamente com o DNA.<sup>135</sup> A partir dos dados resultantes é possível sugerir que a interação entre os complexos e o DNA ocorre efetivamente via sulco menor, o que corrobora com os demais ensaios. Porém, como na literatura é relatado alguns casos em que essa sonda pode ser deslocada por moléculas que se ligam a outras regiões do DNA, foi realizado o estudo de ancoragem molecular com a finalidade de investigar a natureza dessas interações.<sup>136</sup>

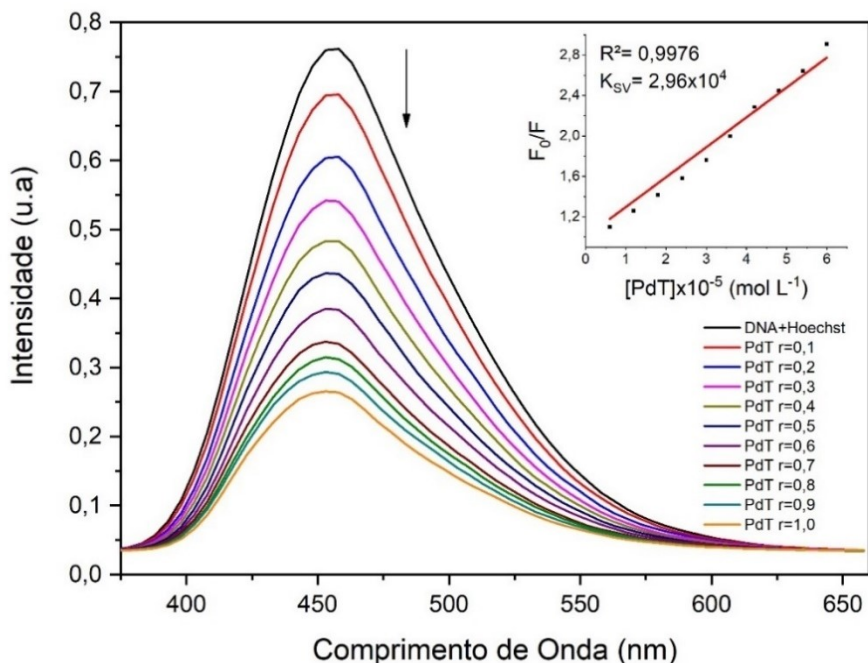


FIGURA 4.45 - Espectro de fluorescência do aduto Hoescht-DNA após a adição de concentrações crescentes do complexo PdT. A concentração de DNA foi mantida fixa em  $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  e do Hoechst em  $6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$  e a concentração dos complexos variou de 0 até  $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

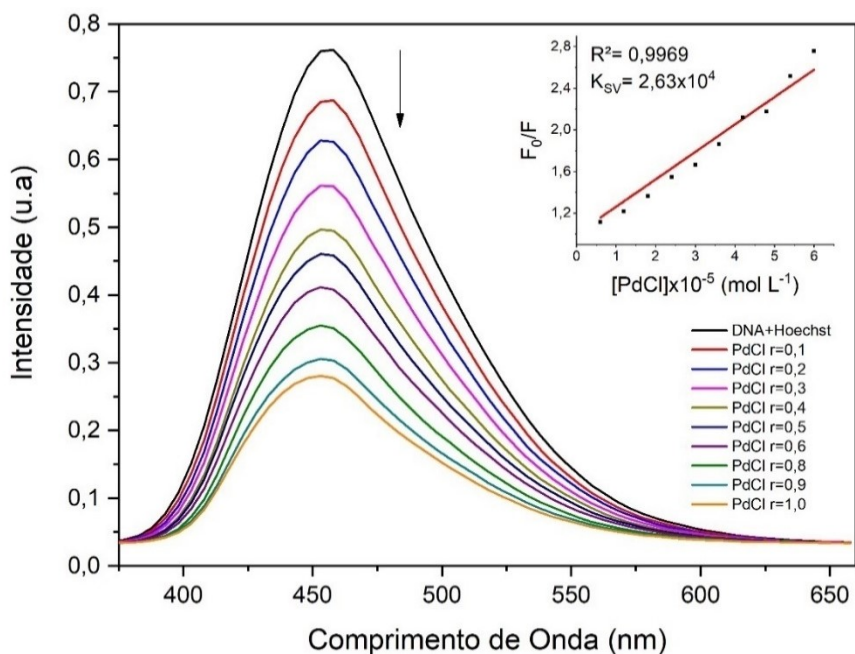


FIGURA 4.46 - Espectro de fluorescência do aduto Hoescht-DNA após a adição de concentrações crescentes do complexo PdCl. A concentração de DNA foi mantida fixa em  $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  e do Hoechst em  $6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$  e a concentração dos complexos variou de 0 até  $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

## 4.11 - Ancoragem molecular

A investigação dos modos de ligação também se procedeu através do estudo de ancoragem molecular, no qual é possível simular interações intermoleculares em sistemas do tipo biomolécula-ligante.<sup>137,138,139</sup> Essa ferramenta é amplamente empregada na caracterização das conformações mais estáveis de ligantes no interior de cavidades de ligação de macromoléculas (ex. DNA, proteínas, dentre outros).

A estrutura de DNA selecionada PDB ID 1BNA está na conformação de hélice da mão direita (forma B), a qual é predominante no organismo humano e coincide com a conformação encontrada para o ct-DNA.<sup>140,141,142</sup> Com base nas simulações, os complexos de Pd(II) apresentaram maior preferência de interação com o sulco menor do DNA, formando complexos estáveis com padrões similares de contatos não covalentes como elucidado na Figura 4.47. Os dados resultantes reforçam aqueles obtidos pelas técnicas de Dicroísmo circular e ensaio competitivo com Hoeschst.

O fragmento *N4—H* da tiossemicarbazona apresentou grande relevância visto que atua como doador de ligação hidrogênio ( $N—H\cdots O$ ) ao átomo de  $O3'$  da subunidade pentose do nucleotídeo de citosina 23 (DC23). Curiosamente, apenas os complexos PdBr, PdCH<sub>3</sub> e PdCl estabeleceram uma ligação hidrogênio não clássica do tipo ( $C—H\cdots\pi$ ) entre o grupamento trifenilfosfina com a subunidade pentose do nucleotídeo guanina 4 (DG4). Dessa forma, foi observado que a presença do substituinte parece ter relação com a orientação dos compostos no sítio de ligação, assim o composto PdT que não apresenta substituinte no heterociclo tiofeno resultou em mudança de sua posição espacial em relação aos compostos análogos. Para esse composto é formado um complexo de interação no qual o grupo trifenilfosfina se localiza fora do sítio de



O composto PtT estabelece uma ligação hidrogênio não clássica do tipo C—H $\cdots$  $\pi$  entre o anel tiofeno do ligante tiossemicarbazona e a subunidade pirimidina da base DT19. Além disso, duas ligações hidrogênio clássicas do tipo (DA18)N—H $\cdots$ N(fragmento hidrazínico) e N4—H $\cdots$ O (fosfato da base DA17) estabilizam o complexo de interação. Para a molécula de PtBr, observam-se principalmente contatos hidrofóbicos com o sítio de ligação. Ou seja, quatro interações fracas do tipo  $\sigma$ — $\pi$  entre grupamentos terminais metilas (—CH<sub>3</sub>) e as bases DG4, DA5, DA17 e DA18. Além disso, também foi observada uma ligação hidrogênio não clássica do tipo N—H $\cdots$ S entre a base DA6 e o átomo de S da tiossemicarbazona, o que estabiliza o complexo no sulco maior do DNA.

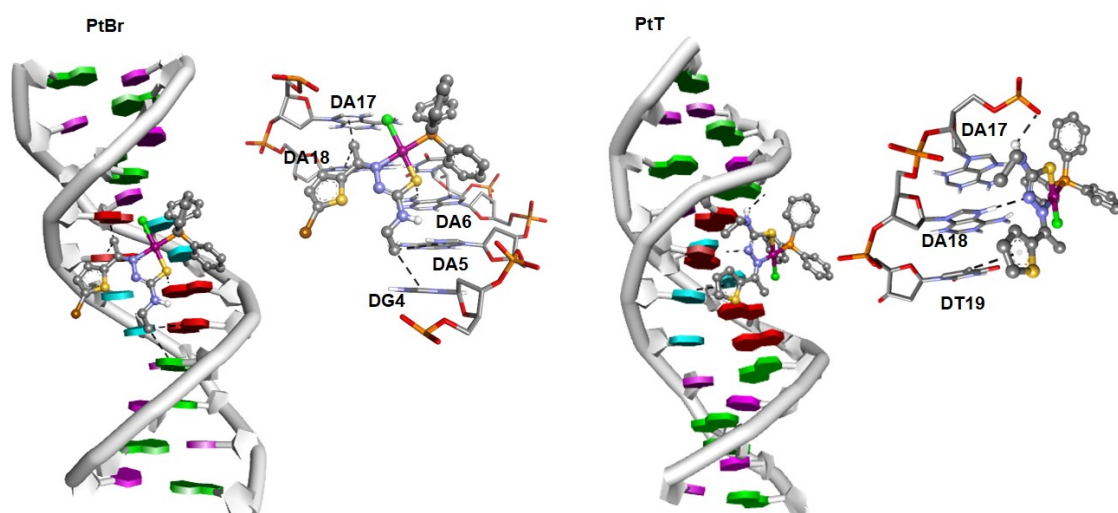


FIGURA 4.48 - Simulação de interação entre os compostos de Pt(II) e o DNA (PDB ID 1NBA) a partir do software autodock4, modo semiflexível. Na figura, os complexos estão desenhados como bolas e bastões, o DNA como cartoon e as interações estão na forma de linhas tracejadas em cor preta. Os hidrogênios não polares foram omitidos para melhor visualização.

Por fim, a técnica de ancoragem molecular revelou duas regiões preferenciais de ligação, isto é, sulco maior e menor do DNA.<sup>64</sup> Os compostos parecem alterar sua orientação dentro dos respectivos bolsões de ligação com base na presença de um substituinte no anel tiofeno. Além disso, é importante salientar

que o modo de interação por intercalação não estabelece complexos estáveis para as estruturas dos compostos investigadas.

Na Tabela 4.12 estão resumidos os parâmetros de seleção dos complexos exportados para análise, com base em suas habilidades em formar complexos estáveis com o DNA ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ). Os valores numéricos gerados a partir das funções de pontuação são decorrentes da modelagem matemática das interações, que ocorrem durante a formação dos complexos estáveis.

TABELA 4.12 - Parâmetro de classificação por afinidade, gerado por ancoragem molecular. Software utilizado: Autodock 4.2.

Complexo	Afinidade/ $\text{kcal mol}^{-1}$	Sítio de ligação
PdBr	-4,48	Sulco menor
PdT	-2,11	
PdCl	-1,92	
PdCH <sub>3</sub>	-1,31	
PtT	-4,41	Sulco maior
PtBr	-0,64	

É importante ressaltar que as simplificações matemáticas, aceleram os cálculos de ancoragem, porém tornam as predições de afinidade menos acuradas.<sup>5,18</sup> Logo, para uma melhor investigação acerca dos parâmetros energéticos, recomenda-se a junção com a técnica de dinâmica molecular.<sup>143</sup>

## 4.12 - Enzimas Topoisomerases

### 4.12.1 - Topoisomerase II $\alpha$ e II $\beta$

Os compostos foram investigados em relação a sua capacidade de inibir a atividade das enzimas Topoisomerases por meio da técnica de eletroforese em gel. Neste ensaio, é possível acompanhar se o composto de interesse consegue inibir o relaxamento da dupla fita do DNA causado por estas enzimas, através de

mudanças conformacionais no plasmídeo superenovelado. Caso o plasmídeo não sofra alteração conformacional, apresentará uma única banda com alta mobilidade eletroforética, atribuída a sua forma superenovelada. A enzima em questão age sobre o plasmídeo relaxando esta estrutura, o que acarreta no aparecimento de uma banda com menor mobilidade. A inibição da topo II $\alpha$  é de grande relevância no desenvolvimento de potenciais agentes antineoplásicos, uma vez que ela está diretamente relacionada ao ciclo celular, estando presente em grandes quantidades em alguns tipos de células cancerosas como de pulmão, próstata, sarcomas e dentre outros.<sup>71</sup> Assim, a inibição enzimática é uma das formas de se evitar a progressão tumoral.

Analisando-se a Figura 4.49, é possível notar que na coluna correspondente ao controle positivo, o qual é constituído por DNA, mix de ensaio e topo II, observa-se a presença somente da banda referente ao plasmídeo relaxado, uma vez que a enzima atuou livremente. Já o controle negativo, composto unicamente pelo plasmídeo superenovelado, apresenta uma única banda de maior mobilidade eletroforética. As demais colunas do gel correspondem a incubação dos compostos com o DNA e topo II $\alpha$  em diferentes concentrações. Desse modo, o resultado revelou que os compostos de paládio não foram capazes de inibir a atividade da enzima nas concentrações testadas, as quais variaram entre 0,1 a 100  $\mu$ M. Tal comportamento é evidenciado a partir da presença da banda correspondente ao DNA relaxado nas colunas referentes aos complexos sendo similar ao padrão de banda obtido no controle positivo. Caso os complexos fossem capazes de inibir a atividade da enzima seria detectado, ao menos, uma diminuição da intensidade das bandas, uma vez que a enzima seria impedida de relaxar o DNA.

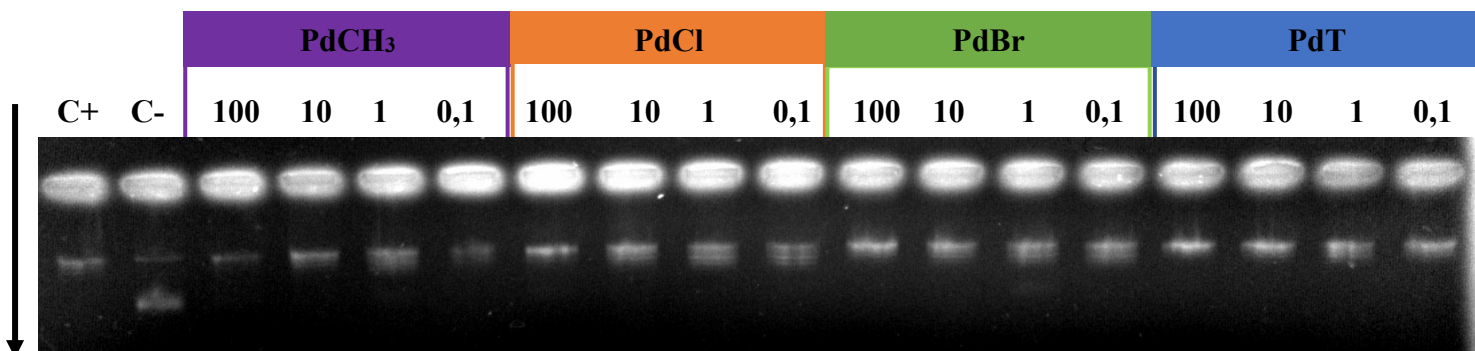


FIGURA 4.49 - Avaliação do efeito dos complexos de paládio frente a enzima topoisomerase II $\alpha$  por eletroforese em gel. C+ (Linha 1): mix, água, DNA e topo II $\alpha$ , C- (Linha 2): mix, água e DNA, Linha 3: PdCH<sub>3</sub> (100  $\mu$ M), Linha 4: PdCH<sub>3</sub> (10  $\mu$ M), Linha 5: PdCH<sub>3</sub> (1  $\mu$ M), Linha 6: PdCH<sub>3</sub> (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PdCl (100  $\mu$ M), Linha 8: PdCl (10  $\mu$ M), Linha 9: PdCl (1  $\mu$ M), Linha 10: PdCl (0,1  $\mu$ M). Linha 11: PdBr (100  $\mu$ M), Linha 12: PdBr (10  $\mu$ M), Linha 13: PdBr (1  $\mu$ M), Linha 14: PdBr (0,1  $\mu$ M). Linha 15: PdT (100  $\mu$ M), Linha 16: PdT (10  $\mu$ M), Linha 17: PdT (1  $\mu$ M), Linha 18: PdT (0,1  $\mu$ M).

Posteriormente, foi verificado que os compostos de platina apresentaram comportamento semelhante aos seus análogos de paládio, como representado na Figura 4.50, indicando que esses também não foram capazes de interferir na ação da enzima. A partir dessa técnica, verificou-se que tanto os complexos de paládio quanto os complexos de platina não interagem com a enzima topoisomerase II $\alpha$ , o que indica que a enzima não é um possível alvo farmacológico em potencial para os compostos em estudo.



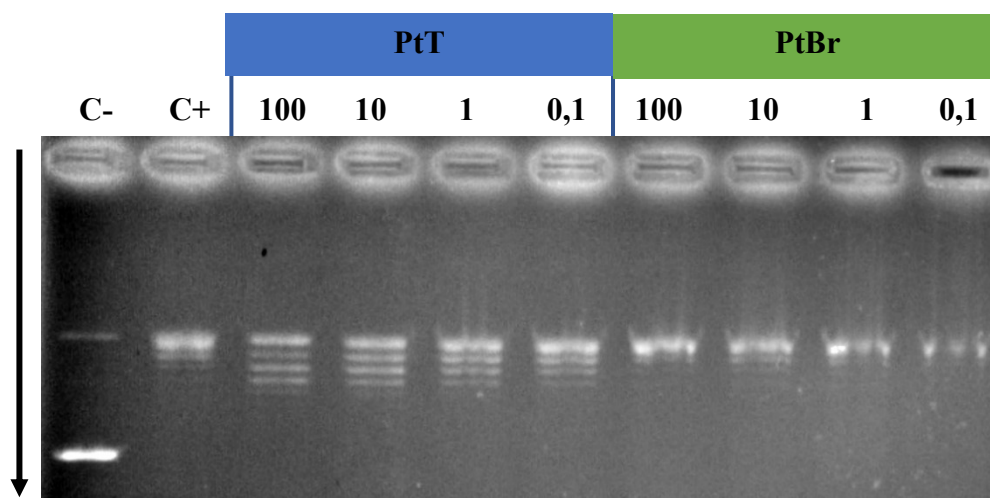


FIGURA 4.50 - Efeito dos complexos de platina frente a enzima topoisomerase II $\alpha$  por eletroforese em gel. C- (Linha 1): mix, água e DNA, C+ (Linha 2): mix, água, DNA e topo II $\alpha$ . Linha 3: PtT (100  $\mu$ M), Linha 4: PtT (10  $\mu$ M), Linha 5: PtT (1  $\mu$ M), Linha 6: PtT (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PtBr (100  $\mu$ M), Linha 8: PtBr (10  $\mu$ M), Linha 9: PtBr (1  $\mu$ M), Linha 10: PtBr (0,1  $\mu$ M).

A capacidade dos complexos em inibir a Topoisomerase II $\beta$  também foi avaliada, uma vez que a interação com essa isoforma está associada ao surgimento de tumores secundários.<sup>69</sup> Desta forma, é interessante que os compostos em estudo sejam capazes de inibir somente a Topo II $\alpha$  com maior expressão em células tumorais e não a Topo II $\beta$ . A ação dos compostos frente a Topo II $\beta$  encontra-se ilustrado na Figura 4.51, pela qual é nítido observar que estes não inibiram a atividade da enzima Topoisomerase II $\beta$ .

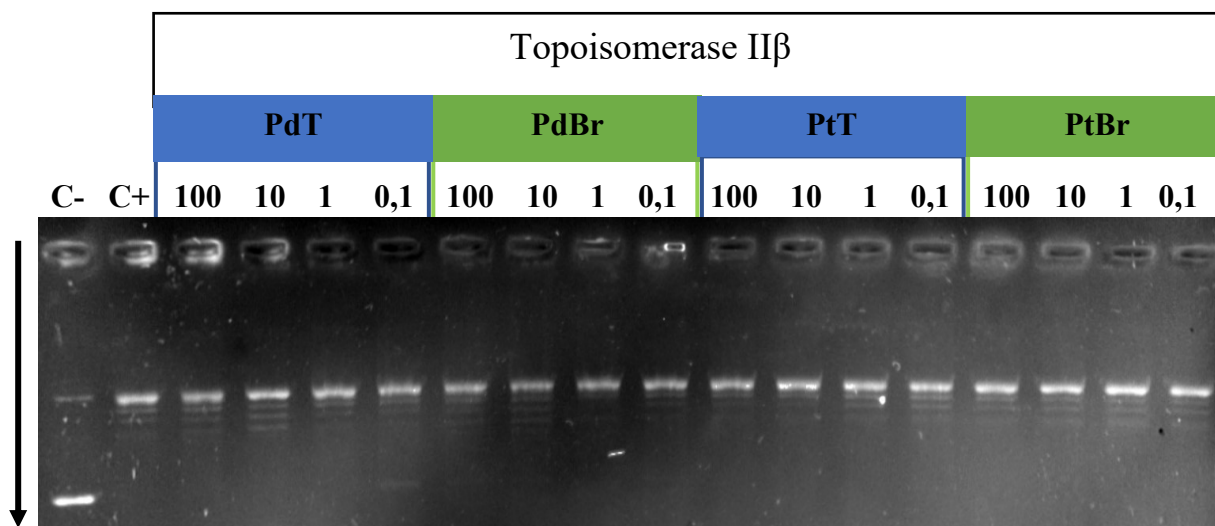


FIGURA 4.51 - Interação entre os complexos PdT e PdBr e seus análogos de platina e a Topoisomerase II $\beta$  por eletroforese em gel. C-(Linha 1): mix, água e DNA, C+(Linha 2): mix, água, DNA e topo II $\beta$ . Linha 3: PdT (100  $\mu$ M), Linha 4: PdT (10  $\mu$ M), Linha 5: PdT (1  $\mu$ M), Linha 6: PdT (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PdBr (100  $\mu$ M), Linha 8: PdBr (10  $\mu$ M), Linha 9: PdBr (1  $\mu$ M), Linha 10: PdBr (0,1  $\mu$ M). Linha 11: PtT (100  $\mu$ M), Linha 12: PtT (10  $\mu$ M), Linha 13: PtT (1  $\mu$ M), Linha 14: PtT (0,1  $\mu$ M). Linha 15: PtBr (100  $\mu$ M), Linha 16: (10  $\mu$ M), Linha 17: PtBr (1  $\mu$ M), Linha 18: PtBr (0,1  $\mu$ M).

#### 4.12.2 - Topoisomerase I $\beta$

Os compostos de interesse foram investigados em relação a sua capacidade de inibirem a Topo I $\beta$ , pois esta encontra-se em alta expressão especialmente em células de rápida proliferação como as células cancerosas. O ensaio eletroforético é praticamente o mesmo realizado frente a Topo II, sendo que a única diferença é que este não necessita de ATP.

Na literatura são relatados alguns complexos de paládio contendo trifenilfosfina como inibidores de topoisomerase I. Dentre os complexos constituídos de tiossemicarbazonas derivadas de pirenos destaca-se o complexo [PdCl(PPh<sub>3</sub>)(HPrCh)], o qual foi capaz de inibir a ação da enzima na concentração de 0,75  $\mu$ M fornecendo uma inibição total em 12,5  $\mu$ M.<sup>81</sup> Esses relatos instigaram a investigação dos compostos de interesse como potenciais inibidores da topoisomerase I. Diante dos dados resultantes da técnica de eletroforese em gel (Figura 4.52), dentre os complexos de paládio, somente o complexo PdCl foi

capaz de inibir, parcialmente, a ação da enzima topoisomerase I, no entanto, apenas em concentrações altas de 100  $\mu\text{M}$ .

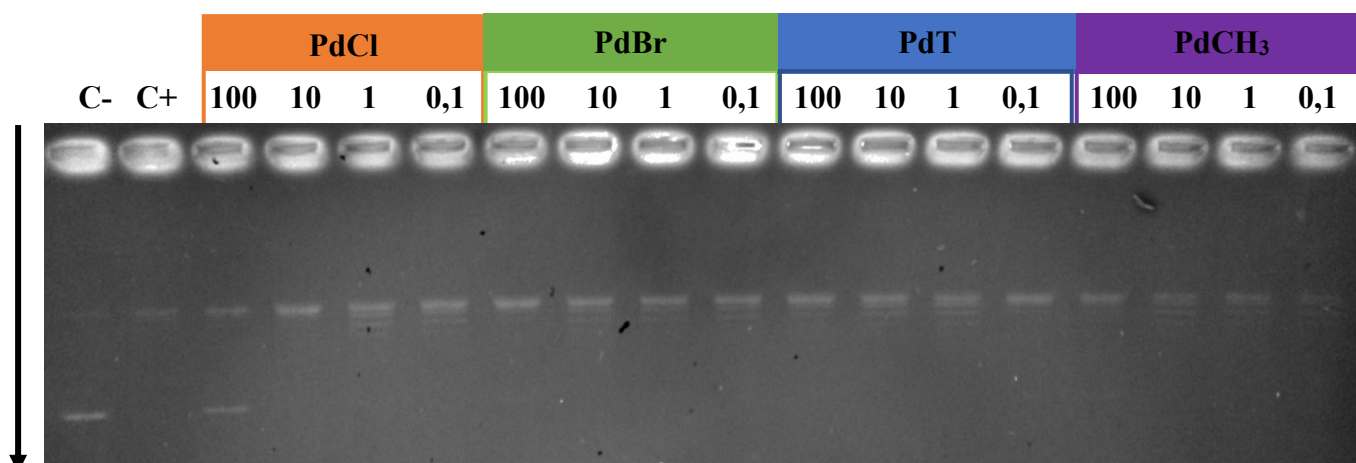


FIGURA 4.52 - Efeito dos complexos de paládio na inibição da Topoisomerase I $\beta$  por eletroforese em gel. C- (Linha 1): mix, água e DNA, C+(Linha 2): mix, água, DNA e topo I $\beta$ . Linha 3: PdCl (100  $\mu\text{M}$ ), Linha 4: PdCl (10  $\mu\text{M}$ ), Linha 5: PdCl (1  $\mu\text{M}$ ), Linha 6 (0,1  $\mu\text{M}$ ). Linha 7: PdBr (100  $\mu\text{M}$ ), Linha 8: PdBr (10  $\mu\text{M}$ ), Linha 9: PdBr (1  $\mu\text{M}$ ), Linha 10: PdBr (0,1  $\mu\text{M}$ ). Linha 11: PdT (100  $\mu\text{M}$ ), Linha 12: PdT (10  $\mu\text{M}$ ), Linha 13: PdT (1  $\mu\text{M}$ ), Linha 14: PdT (0,1  $\mu\text{M}$ ). Linha 15: PdCH<sub>3</sub> (100  $\mu\text{M}$ ), Linha 16: PdCH<sub>3</sub> (10  $\mu\text{M}$ ), Linha 17: PdCH<sub>3</sub> (1  $\mu\text{M}$ ), Linha 18: PdCH<sub>3</sub> (0,1  $\mu\text{M}$ ).

Na Figura 4.53 é visto que os complexos de platina interferiram na ação da enzima topoisomerase IB. A inibição ocorre parcialmente, e isso é evidenciado pelo não desaparecimento total da banda referente ao DNA relaxado, o que indica que a enzima continua realizando a sua função. Assim, foi verificado que os compostos de platina são seletivos frente a Topoisomerase I $\beta$ .

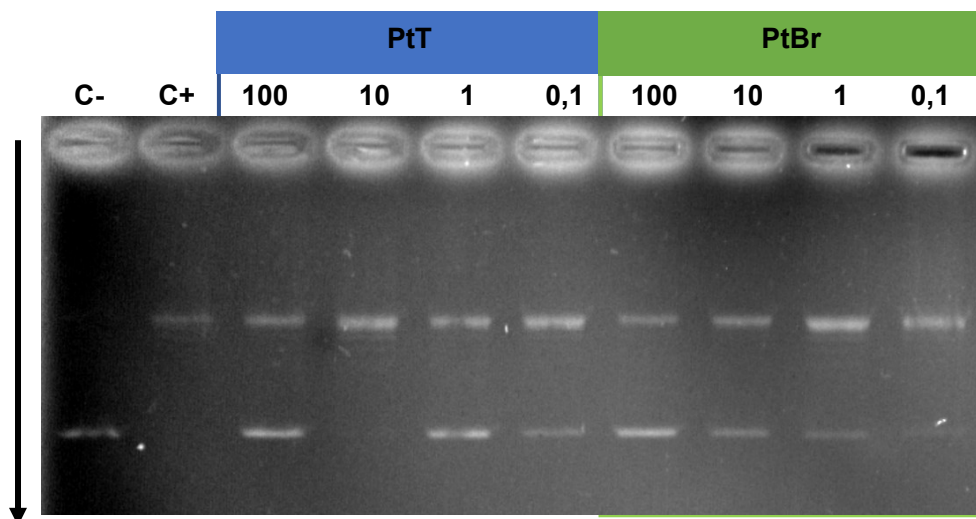


FIGURA 4.53 - Interação entre os complexos de platina e a enzima Topoisomerase I $\beta$  por eletroforese em gel. C- (Linha 1): mix, água e DNA, C+ (Linha 2): mix, água, DNA e topo I $\beta$ . Linha 3: PtT (100  $\mu$ M), Linha 4: PtT (10  $\mu$ M), Linha 5: PtT (1  $\mu$ M), Linha 6: PtT (0,1  $\mu$ M). Linha 7: PtBr (100  $\mu$ M), Linha 8: PtBr (10  $\mu$ M), Linha 9: PtBr (1  $\mu$ M), Linha 10: PtBr (0,1  $\mu$ M).

## 4.13 - Ensaios celulares

### 4.13.1 - Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação citotóxica foi realizada *in vitro* pelo método colorimétrico MTT, empregando o reagente sal de tetrazólio azul de tiazolil, o qual é reduzido a Formazan, cristais de coloração violeta, que permitem quantificação indireta de células vivas via espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível.<sup>144</sup>

As linhagens celulares tumorais MDA-MB-231, A549 e DU-145 foram escolhidas por estarem entre os tipos de câncer mais incidentes. É importante salientar que a linhagem MDA-MB-231 é considerada uma linhagem de câncer de mama triplo negativa (TNBC), sendo por este motivo uma linhagem muito agressiva e metastática, e conseqüentemente de difícil tratamento.<sup>145</sup> A linhagem não tumoral MRC5 foi selecionada para termos comparativos, uma vez

que é de interesse ter conhecimento se os compostos exibem maior preferência pelas células tumorais. Já a linhagem tumoral de ovário (A2780 cis) foi escolhida por ser resistente a cisplatina. Destaca-se que a resistência continua sendo um dos grandes desafios no tratamento dos diversos tipos de câncer, e por isso, é de extrema relevância o desenvolvimento de compostos capazes de serem citotóxicos frente a esta linhagem.<sup>146</sup>

Os resultados provenientes dos ensaios de citotoxicidade para os ligantes evidenciaram que estes não são citotóxicos frente as linhagens celulares nas condições avaliadas. Tais compostos exibiram valores de  $IC_{50} > 100 \mu M$  como pode ser visto na Tabela 4.13.

TABELA 4.13 - Valores de  $IC_{50}$  para os ligantes obtidos a partir das concentrações de 0,8 a 100  $\mu M$ .

<b>Compostos</b>	<b>DU-145</b>	<b>MRC5</b>	<b>A549</b>	<b>MDA-MB-231</b>	<b>A2780 Cis</b>
CLM	>100	>100	>100	>100	>100
CLT	>100	>100	>100	>100	>100
MMT	>100	>100	>100	>100	>100
TMT	>100	>100	>100	>100	>100
BRM	>100	>100	>100	>100	>100
BRT	>100	>100	>100	>100	>100
BRET	>100	>100	>100	>100	>100
MTET	>100	>100	>100	>100	>100
CLET	>100	>100	>100	>100	>100
TET	>100	>100	>100	>100	>100

Os complexos de paládio foram ativos em todas as linhagens, sendo mais promissores frente as células de pulmão (A549) e de ovário (A2780 Cis) com valores de  $IC_{50}$  consideravelmente baixos, inclusive quando comparados ao fármaco cisplatina, como representado na Tabela 4.14. O composto PdT foi o mais citotóxico na A549 e o menos tóxico para a linhagem não-tumoral (MRC5) apresentando um índice de seletividade de 4,27. Diante disso, foi escolhido para a realização de testes celulares adicionais, como o ensaio morfológico e de migração celular frente a essa linhagem. Vale ressaltar a alta

citotoxicidade dos complexos de paládio frente a linhagem tumoral de ovário (A2780 Cis) exibindo índice de seletividade em torno de 40, e sendo de 100-200 vezes mais ativos do que a cisplatina. Adicionalmente, foi possível observar a importância da natureza do íon metálico para a atividade citotóxica, uma vez que os complexos de platina se apresentaram inativos frente a todas as linhagens testadas. Indicando um papel ativo do íon metálico no modo de ação.

Diante dos resultados obtidos, a linhagem celular A2780 Cis foi selecionada para a realização de estudos posteriores, tais como: avaliação da influência na formação de colônias, na morfologia e migração celular, nos ensaios de ciclo celular e apoptose. O composto PdCH<sub>3</sub> foi selecionado para ser investigado em relação ao seu comportamento frente essa linhagem, uma vez que esse foi um dos compostos que apresentou maior capacidade de interação com o DNA.

TABELA 4.14 - Valores de IC<sub>50</sub> para os complexos obtidos a partir das concentrações de 0,8 a 100 µM.

Compostos	DU-145	MRC5	A549	MDA-MB-231	A2780 Cis	IS*	IS**
PdT	16,65 ± 0,18	8,46 ± 0,06	1,98 ± 0,09	8,94 ± 0,02	0,24 ± 0,02	4,27	35,25
PdBr	9,48 ± 0,38	5,61 ± 0,23	5,14 ± 0,22	24,74 ± 0,13	0,15 ± 0,01	1,09	37,40
PdCl	23,42 ± 0,28	5,22 ± 0,06	2,50 ± 0,06	23,57 ± 0,38	0,11 ± 0,06	2,09	47,45
PdCH <sub>3</sub>	10,45 ± 0,06	5,69 ± 0,11	4,52 ± 0,03	6,21 ± 0,31	0,14 ± 0,01	1,26	40,64
PtBr	>100	>100	>100	>100	>100	-	
PtT	>100	>100	>100	>100	>100	-	
Cisplatina	2,3 ± 0,4	29,09 ± 0,78	14,40 ± 1,40	2,40 ± 0,20	25,61 ± 0,29	2,02	

\*IS: (MRC5/A549) \*\*IS: (MRC5/A2780 Cis)

A fim de se investigar se a fotosensibilidade dos complexos de paládio em solução de DMSO poderia afetar sua atividade biológica, foi realizado o ensaio de citotoxicidade sem a presença de luz para o complexo PdT. A linhagem A2780 Cis, a mais sensível a ação dos compostos, foi selecionada para a realização do teste. Para a realização do ensaio, as soluções, protegidas da luz, contendo as diferentes concentrações dos compostos foram preparadas 24h antes da adição nas placas. O protocolo experimental foi

realizado conforme descrito na metodologia e foi observado que o composto apresentou IC<sub>50</sub> de  $0,21 \pm 0,01 \mu\text{M}$ , o qual está próximo ao valor encontrado anteriormente com exposição a luz ( $0,24 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ). Frente ao exposto, verificou-se que a exposição a luz não interfere em sua atividade citotóxica.

#### **4.13.2 - Ensaio de Migração Celular – Wound Healing (A549)**

A capacidade dos complexos de inibir a migração celular em células tumorais de pulmão (A549) foi investigada pelo ensaio de *Wound Healing*, no qual as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo PdT. As imagens foram registradas no intervalo de tempo de 0 a 48h.<sup>147</sup> Ao observar a influência do composto no fechamento da risca comparado com o controle (0,5% DMSO) foi verificado a capacidade do PdT em inibir a migração em todas as concentrações avaliadas (0,99, 0,495 e 0,247  $\mu\text{M}$ ), as quais são inferiores ao seu valor de IC<sub>50</sub>. Sendo observado que a inibição da migração é maior na concentração mais alta de 0,99  $\mu\text{M}$ , conforme ilustrado na Figura 4.54.

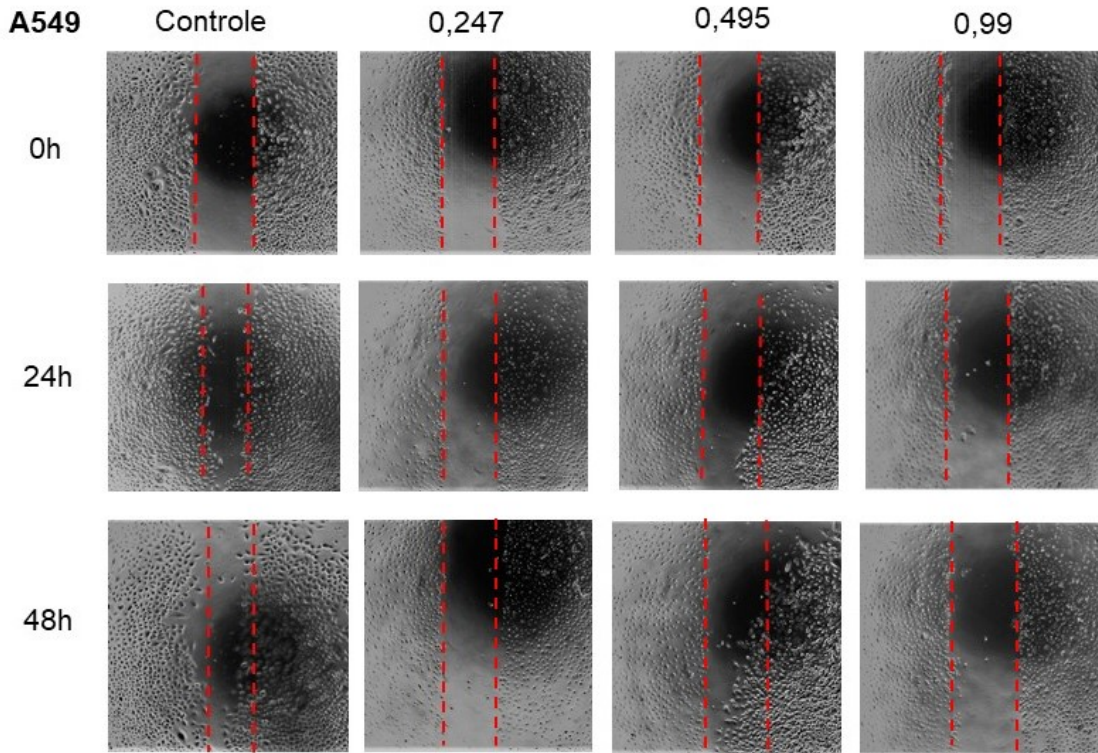


FIGURA 4.54 - Efeito do complexo PdT na migração celular da linhagem A549 nas concentrações de 0,247, 0,495 e 0,99  $\mu\text{M}$  e nos tempos de 0, 24 e 48h.

A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do *software ImageJ* em triplicata para cada concentração. A porcentagem de fechamento da risca foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\% \text{ Fechamento da risca} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / (A_{t=0h})] \times 100$$

onde,  $A_{t=0h}$ : medida da área riscada no tempo de 0 h e  $A_{t=\Delta h}$ : medida da área riscada no tempo de 24 e 48 h.<sup>96,97,148</sup>

A análise dos dados em porcentagem correspondentes ao fechamento da risca indicou que no controle a área diminuiu 37,87% em 24h, enquanto nos poços contendo o complexo PdT referentes as concentrações 0,247, 0,495 e 0,990  $\mu\text{M}$  essa diminuição foi de 9,78, 6,16 e 3,85%, respectivamente. Desta forma, foi observado um aumento da inibição da migração conforme ocorre o aumento da concentração obtendo-se 93,17% de inibição na concentração mais alta de 0,99



$\mu\text{M}$ . Em 48h a área do risco do controle diminuiu 45,72% e as áreas referentes as concentrações 0,247, 0,495 e 0,990  $\mu\text{M}$  diminuiram 28,68, 18,18 e 6,11%, conforme representado no gráfico da Figura 4.55. Isto indicou uma inibição de migração de 95,84%, na maior concentração. Sendo assim, a partir dos dados resultantes pode-se inferir que o composto é capaz de inibir a migração celular de forma eficiente.

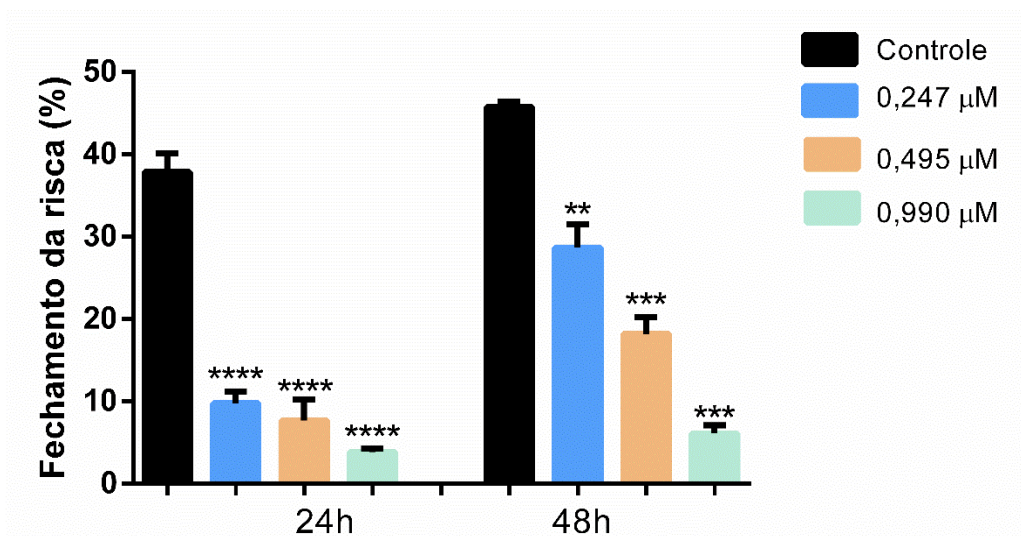


FIGURA 4.55 - Efeito do complexo PdT em diferentes concentrações na migração celular da linhagem A549. Dados da área de fechamento da risca foram obtidos a partir das imagens em triplicata no *software ImageJ*. Níveis de significância \*\* $p=0.0095$ , \*\*\* $p=0.0001$  e \*\*\*\* $p<0.0001$  utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em  $\pm$  DS ( $n=3$ ).

Esses são resultados promissores, uma vez que a migração celular é uma etapa presente no processo de metástase, o qual é responsável pela propagação do tumor para outras regiões do corpo. Assim a inibição da migração pode impedir a formação de tumores secundários, bem como de efeitos colaterais.<sup>2,147</sup>

### **4.13.3 - Ensaio de Morfologia Celular (A549)**

A capacidade do composto PdT, em diferentes concentrações (0,495 a 7,92  $\mu\text{M}$ ), em alterar a morfologia das células também foi explorada frente a linhagem celular tumoral A549. Ao avaliar as imagens registradas (Figura 4.56) entre 0 e 48h, pode-se indicar que o composto foi capaz de induzir a diminuição da densidade celular. Tal comportamento é evidenciado na concentração referente ao  $\text{IC}_{50}$ , cujo valor é 1,98  $\mu\text{M}$ , e nas concentrações acima desse valor. Porém, não foram observadas mudanças significativas na morfologia das células, inclusive quando expostas a concentração mais alta de 7,92  $\mu\text{M}$ . Tal fato, aponta para uma ação citostática do composto analisado.<sup>149</sup>

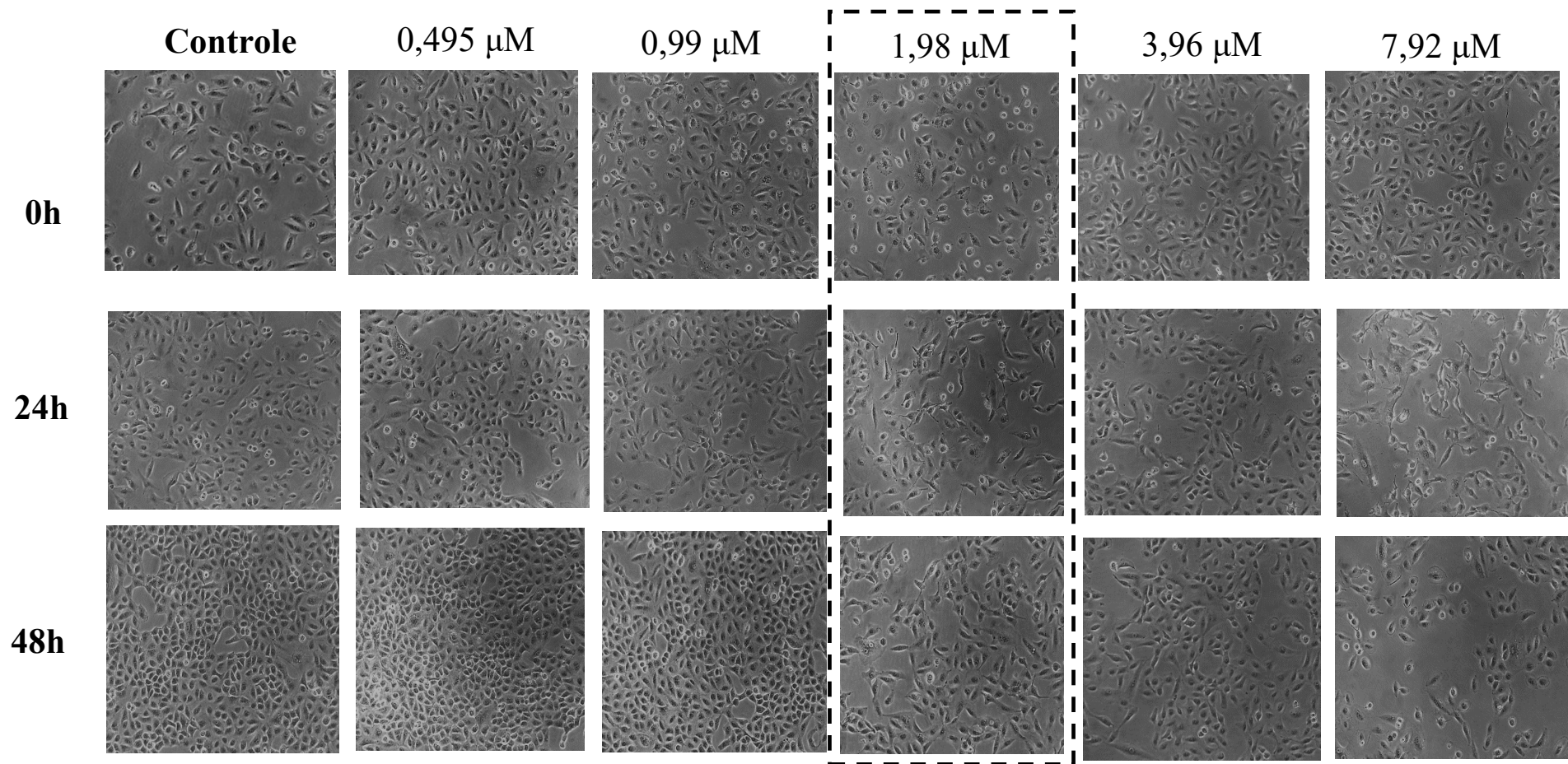


FIGURA 4.56 - Ensaio de morfologia celular para o complexo PdT na linhagem celular tumoral A549 nas concentrações entre 0,495 a 7,92  $\mu\text{M}$  e imagens capturadas nos tempos de 0, 24 e 48h.

#### 4.13.4 - Ensaio de Migração Celular – Wound Healing (A2780 Cis)

O composto PdCH<sub>3</sub> foi investigado em relação a sua capacidade em inibir a migração de células provenientes da linhagem tumoral A2780 Cis. A partir do tratamento da célula com diferentes concentrações do complexo (0,01, 0,03, 0,07), analisou-se o fechamento da risca nos tempos de 0, 24 e 48h. Pela Figura 4.57 é notado que o composto é capaz de induzir a redução da migração celular em todas as concentrações analisadas, sendo mais pronunciada na concentração mais alta de 0,07 μM.

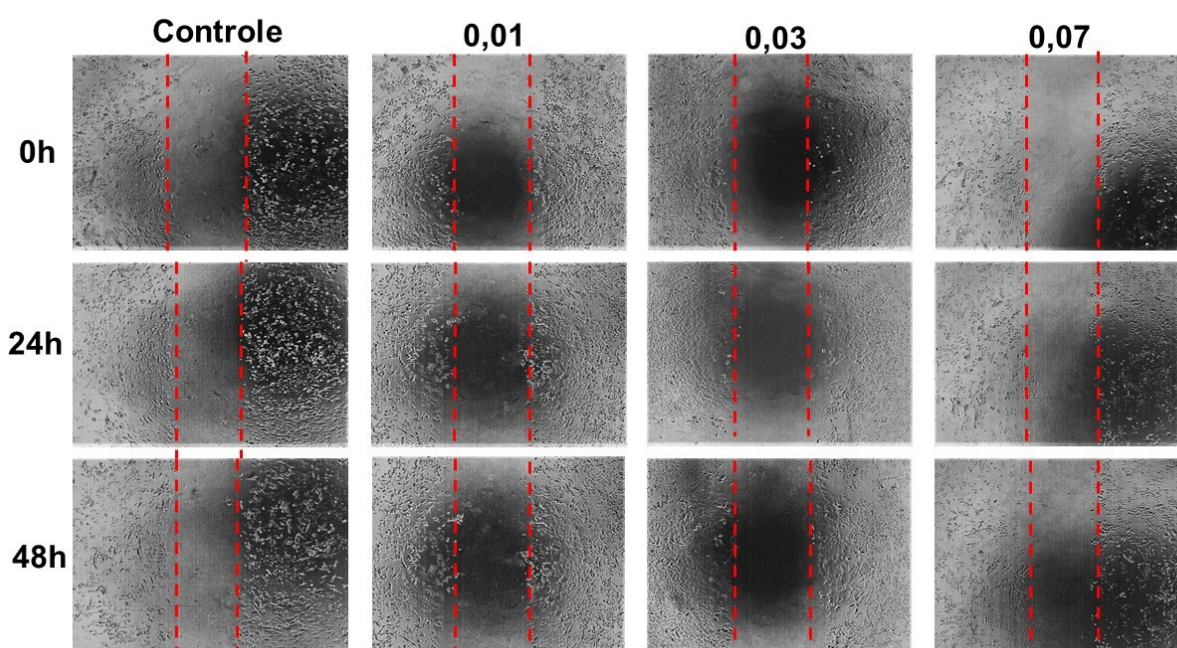


FIGURA 4.57 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na migração celular da linhagem A2780 Cis nas concentrações de 0,01, 0,03 e 0,07 μM nos tempos de 0, 24 e 48h.

A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do *software ImageJ* e a porcentagem de fechamento da mesma foi calculada pela equação demonstrada anteriormente, a qual é descrita na literatura.<sup>147</sup> A partir das medições realizadas foi observado que a área do controle diminuiu 35,40% em 24h, enquanto as áreas correspondentes as concentrações 0,017, 0,035 e 0,070 μM exibiram uma diminuição de 21,93, 13,28 e 2,76%, respectivamente. Em 48h, para o controle observou-se uma diminuição da área

analisada de 50,35%. Para as diferentes concentrações 0,017, 0,035 e 0,070  $\mu\text{M}$ , foi sinalizada uma diminuição da área de 44,52, 16,06 e 8,41%. Os valores de fechamento da risca indicaram que ocorreu um aumento da inibição de migração celular com o aumento da concentração, como pode ser visto no gráfico representado na Figura 4.58. Destacando uma inibição mais pronunciada em 0,070  $\mu\text{M}$ , equivalente a 91,58% em 48h.

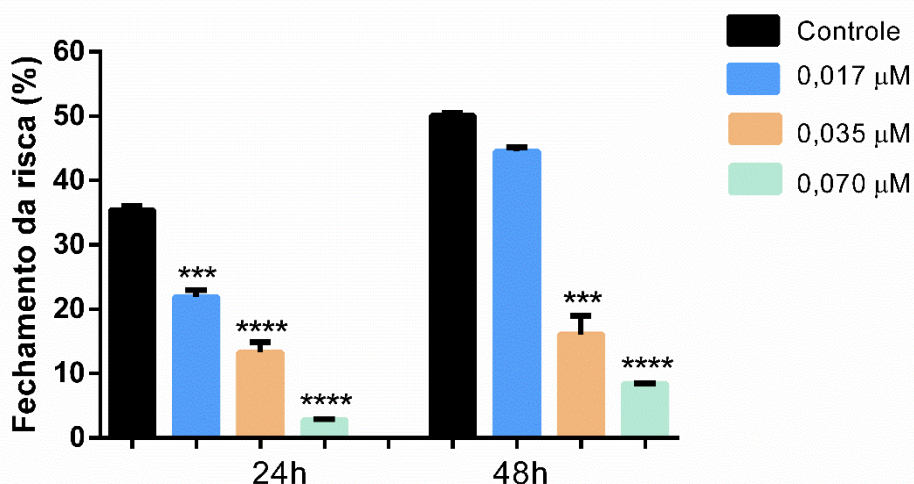


FIGURA 4.58 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> em diferentes concentrações na migração celular da linhagem A2780 Cis. Dados da área de fechamento da risca foram obtidos a partir das imagens em triplicata no *software ImageJ*. Níveis de significância \*\*\* $p=0.0001$  e \*\*\*\* $p<0.0001$  utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em  $\pm$  DS ( $n=3$ ).

#### 4.13.5 - Ensaio de Morfologia Celular (A2780 Cis)

A investigação das alterações morfológicas induzida pelo complexo PdCH<sub>3</sub> frente a linhagem tumoral de ovário (A2780 Cis) foi analisada após a exposição das células ao composto em diferentes concentrações ( $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, 2x IC<sub>50</sub> e 4x IC<sub>50</sub>), nos tempos de 0, 24 e 48 h.

As imagens capturadas em 10X correspondentes a todas as concentrações avaliadas estão representadas na Figura 4.59. A partir das imagens foi observado que o composto foi capaz de diminuir de forma significativa a densidade celular nas concentrações de 0,14  $\mu\text{M}$ , correspondente ao valor de IC<sub>50</sub> do composto, bem como nas concentrações maiores de 0,28 e 0,56  $\mu\text{M}$ . Além

disso, o composto também promoveu a mudança perceptível em relação a morfologia celular. Sendo observado células de formato esférico nas concentrações de 0,14 a 0,56  $\mu\text{M}$ . Além disso, nas concentrações maiores foram observadas células desaderidas, cujo é indicativo de morte celular.<sup>150,151</sup>

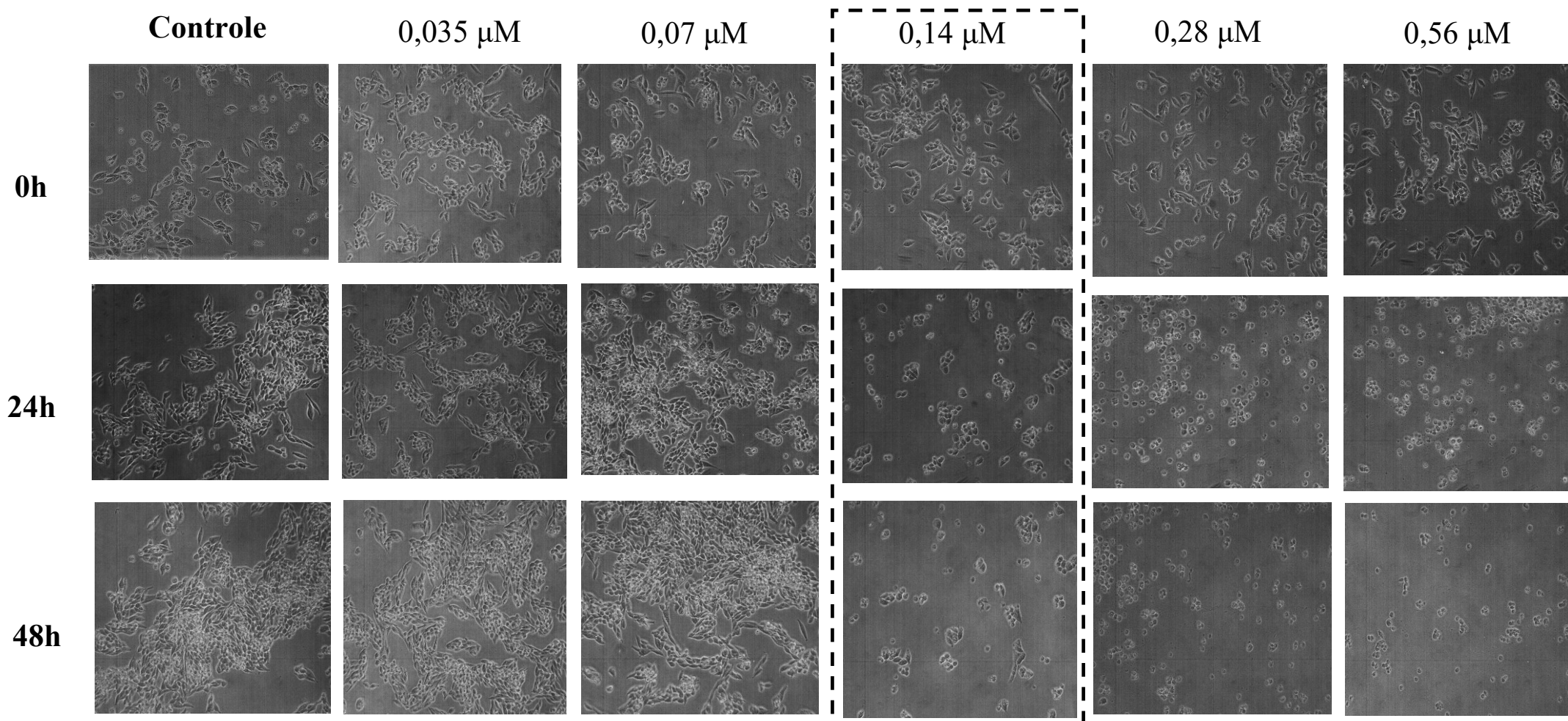


FIGURA 4.59 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na morfologia da linhagem celular A2780 Cis nas concentrações entre 0,035 a 0,56  $\mu\text{M}$  e imagens capturadas nos tempos de 0, 24 e 48h.

Para uma melhor visualização das mudanças morfológicas provocadas pelo composto PdCH<sub>3</sub> frente a linhagem celular tumoral de próstata (A2780 Cis), as imagens nas concentrações 0,14 e 0,28 µM foram capturadas em 20X, as quais estão representadas na Figura 4.60.

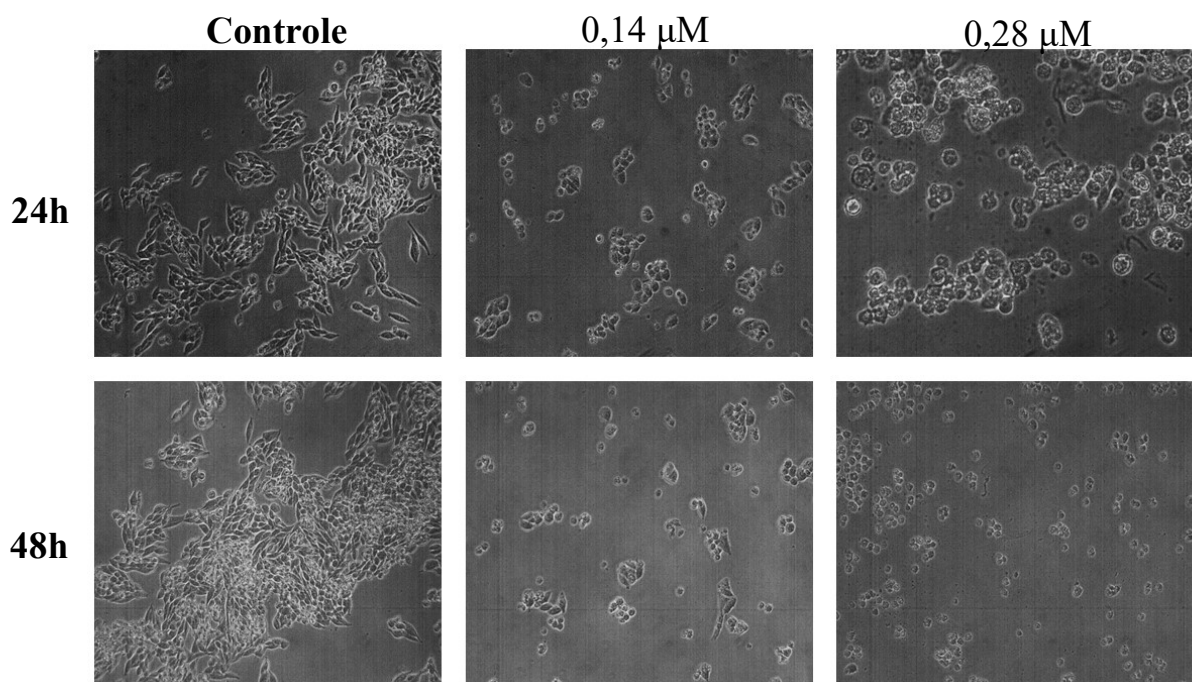


FIGURA 4.60 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na morfologia da linhagem celular A2780 Cis nas concentrações 0,14 µM e 0,28 µM nos tempos de 24 e 48h.

Os dados resultantes tanto do ensaio de Wound Healing, quanto de morfologia celular inferem que o composto PdCH<sub>3</sub> apresenta comportamento citotóxico, tornando-o um composto promissor, aliado ao seu baixo valor de concentração inibitória mínima frente a linhagem em específico, com valores de IS maiores do que 40. Face ao exposto, o composto foi investigado em relação a sua capacidade de interferir no ciclo celular e iniciar o processo de apoptose.

#### 4.13.6 – Ensaio de formação de colônias

O ensaio de sobrevivência clonogênica avalia a capacidade de uma célula sobreviver e formar colônias após o tratamento com um composto de interesse.<sup>152</sup> A capacidade de sobrevivência foi avaliada por um período de 10



dias, após 48h de tratamento das células com diferentes concentrações do composto PdCH<sub>3</sub>. A partir desse ensaio foi possível observar que o complexo foi capaz de diminuir a formação de colônias das células da linhagem tumoral de ovário (A2780 Cis). Essa diminuição foi proporcional ao aumento da concentração do complexo, assim nas maiores concentrações de 0,28 μM e 0,56 μM, não foi perceptível a presença de colônias. Os resultados obtidos evidenciaram que os efeitos citotóxicos são dependentes da concentração como demonstrado na Figura 4.61. Esse resultado reforça a ideia de uma ação citotóxica para o complexo PdCH<sub>3</sub>, como foi indicado no ensaio de morfologia celular.

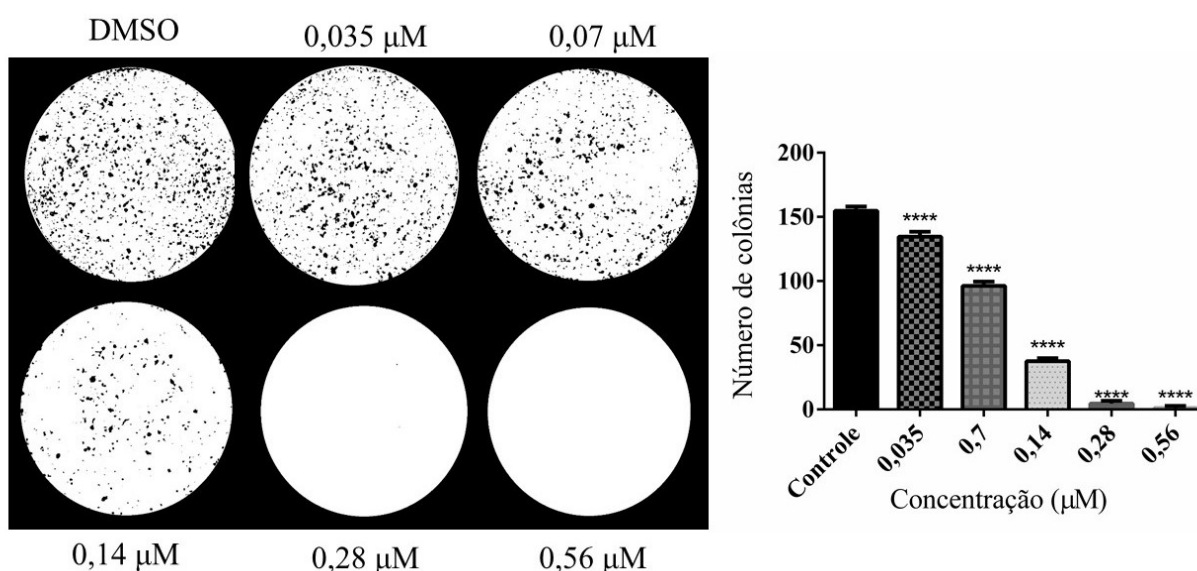


FIGURA 4.61 - Efeito da influência do complexo PdCH<sub>3</sub> em diferentes concentrações (0,035 a 0,56 μM) na formação de colônias de células da linhagem A2780 Cis. Número de colônias em cada concentração foi obtido a partir das imagens em triplicata no *software ImageJ*. Nível de significância \*\*\*\*p<0.0001 utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em ± DS (n=3).

#### 4.13.7 – Avaliação do Ciclo Celular

O ciclo celular (Figura 4.62) é constituído por uma sequência de etapas que garantem a divisão das células de forma regulada, impedindo o desenvolvimento de condições desfavoráveis, tais como danos ao DNA e

organelas ou qualquer outro tipo de anomalia. As etapas que constituem a fase de intérfase presente no ciclo celular são denominadas como G0/G1, S, G2 e SubG1, enquanto a etapa de mitose é caracterizada pela ocorrência de divisão celular. Na fase G0/G1 a célula se prepara para a síntese do DNA, que ocorre na fase S, enquanto na fase G2 a célula se prepara para divisão celular que ocorrerá na fase M.<sup>153</sup>

A verificação dos componentes celulares ocorre via três pontos de checagem, os quais funcionam como um mecanismo de controle. Estes são responsáveis por definir se ocorre ou não a progressão das células no ciclo. Portanto, se os pontos de checagem detectarem algum problema ou erro, o mesmo pode ser reparado, possibilitando a continuação da divisão celular, em contrapartida se os danos forem irreparáveis o processo de apoptose é induzido.<sup>154</sup>

Os agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos atuam sobre as células que se encontram no ciclo celular como agentes antimetabólitos, alcalóides e hormônios. Enquanto os compostos que são classificados como ciclo-celular não específicos exterminam as células tumorais independente se estas estão no ciclo celular ou em repouso, como é o caso dos antibióticos, complexos de platina e agentes alquilantes.<sup>1</sup> Dessa forma, a análise de paragem do ciclo celular para o composto em estudo foi investigada através de citometria de fluxo.

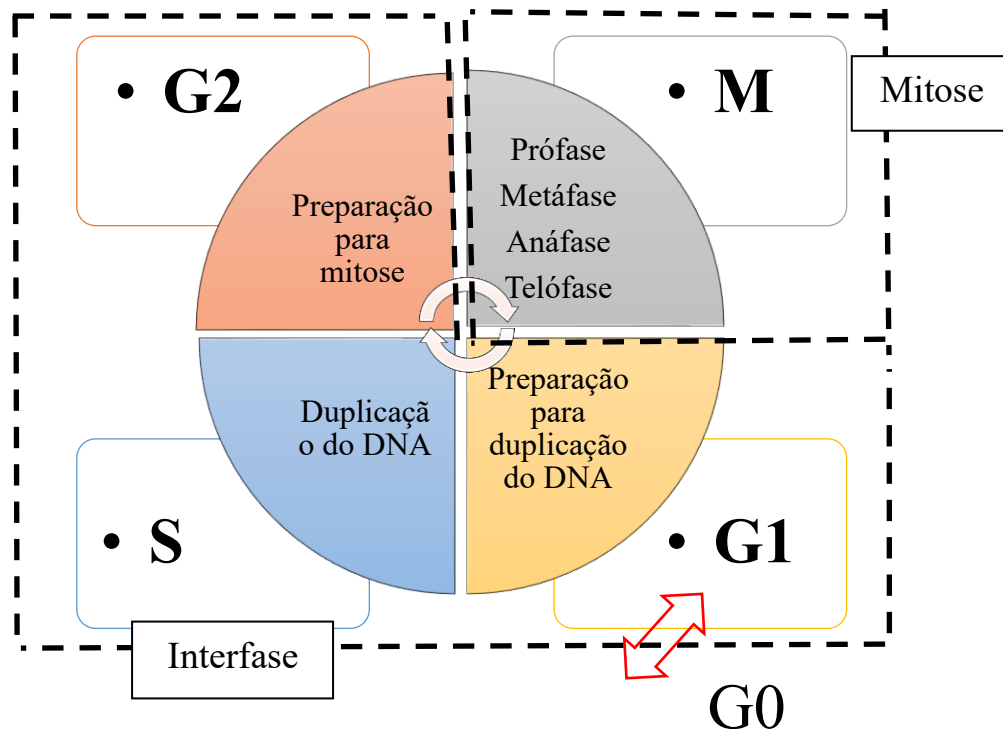


FIGURA 4.62 - Representação esquemática do Ciclo celular.

Antes da realização da análise por citometria de fluxo, as células são tratadas com um corante fluorescente, o mais comumente utilizado é o iodeto de propídeo, que cora quantitativamente o DNA. A partir dos dados provenientes da análise é possível inferir se o composto de interesse é capaz de interferir efetivamente em uma das etapas do ciclo celular.<sup>155</sup>

O ensaio de ciclo celular na linhagem tumoral de ovário (A2780 Cis) revelou que o composto PdCH<sub>3</sub> proporcionou o acúmulo de células na fase Sub-G1, de forma proporcional ao aumento da concentração do complexo (Figura 4.63). Foi possível observar que no controle a maioria das células se encontram nas fases G1 e G2 do ciclo celular. Após a exposição das células ao composto, foi possível observar um acúmulo de células na fase Sub-G1 a partir da concentração de 0,28 µM, sendo massiva a presença celular, 83,4%, na concentração de 0,56 µM. A diminuição de células na fase G2 e consequente aumento na fase Sub G1 pode ser um indício de que o composto induz o processo de apoptose.<sup>156</sup>

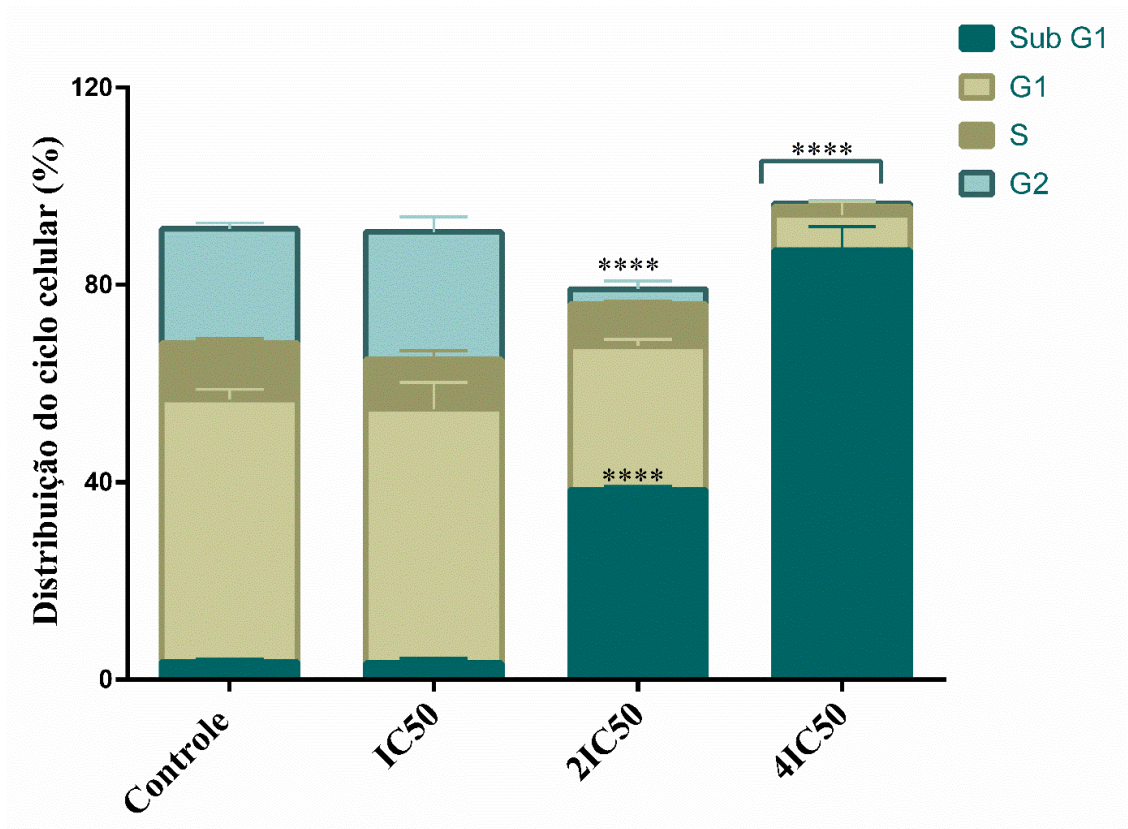


FIGURA 4.63 - Efeito do complexo PdCH<sub>3</sub> na distribuição do ciclo celular de células da linhagem A2780 Cis em diferentes concentrações (0,14, 0,28 e 0,56  $\mu$ M). Nível de significância \*\*\*\* $p < 0.0001$  utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em  $\pm$  DS (n=3).

## Capítulo 5 - CONCLUSÕES

---

Neste trabalho foram sintetizados dezesseis compostos contendo tiossemicarbazonas derivadas do heterociclo tiofeno, sendo dez ligantes e seis novos complexos contendo paládio(II) ou platina(II).

Os compostos foram caracterizados a partir de técnicas como espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia na região do Ultravioleta-visível, Ressonância Magnética Nuclear ( $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ), análise elementar e espectrometria de massas ESI/MS. Essas contribuíram para elucidação das estruturas obtidas, as quais foram condizentes com a proposta estrutural inicial. A confirmação estrutural foi possível através da análise de difração de raios X em monocristal. Através dos resultados, foi possível indicar a obtenção de complexos com geometria quadrática plana distorcida. Os ligantes TSCs se coordenaram ao centro metálico de forma bidentada via átomos de nitrogênio e enxofre, os demais sítios de coordenação são ocupados pela trifenilfosfina e um átomo de cloro. De acordo com as análises de condutividade e estabilidade, o ligante clorido não é labilizado em solução de DMSO e DMSO/meio de cultura.

As sínteses dos complexos apresentaram desafios devido a ampla possibilidade de diferentes modos de coordenação, tanto observados experimentalmente quanto reportados na literatura. Estes apresentaram um comportamento diferente em ambientes iluminados e protegidos da luz, tal observação foi verificada somente através da técnica de ultravioleta-visível. Os demais ensaios de estabilidade indicaram que os compostos estavam aptos para ensaios de citotoxicidade, nos quais é usado uma pequena quantidade de DMSO. Os resultados provenientes destes ensaios mostraram que a atividade citotóxica não foi afetada em relação a presença de luz ou não.

A partir da investigação de um possível alvo biológico para esses compostos, diversos ensaios frente a biomolécula de DNA foram realizados, tais

como: Titulação espectroscópica por ultravioleta-visível; eletroforese em gel; viscosidade; espectroscopia de dicroísmo circular; ensaio de competição com Hoechst 33342; docagem molecular. Todas as análises indicaram interações intermediárias ou fracas entre os complexos e o DNA, preferencialmente, via sulco maior para os complexos de platina e menor para os de paládio. A ancoragem molecular forneceu indícios de que a orientação dentro dos respectivos bolsões de ligação é influenciada pela natureza do substituinte no anel tiofeno.

A avaliação da capacidade dos complexos em inibirem a ação das enzimas Topoisomerases II $\alpha$ , II $\beta$  e I $\beta$  revelou que os complexos de platina foram seletivos frente a inibição da enzima topoisomerase I $\beta$  em todas as concentrações avaliadas (0,1-100  $\mu$ M), sendo inativo em relação as outras enzimas topoisomerases II $\alpha$  e II $\beta$ , assim como seus análogos de paládio. No entanto, isso não conferiu uma citotoxicidade para os complexos, descartando essas enzimas como alvos terapêuticos.

A avaliação citotóxica dos compostos pelo método MTT demonstrou que os ligantes e os complexos de platina foram inativos frente a todas as linhagens celulares avaliadas exibindo valor de IC<sub>50</sub> > 100  $\mu$ M. Já os complexos de paládio se mostraram promissores, principalmente, em relação as linhagens celulares tumorais de pulmão (A549) e de ovário (A2780 Cis). Os complexos de paládio apresentaram uma preferência significativa em relação as células de ovário e apresentaram índices de seletividade em torno de 40, o que indica que os complexos de paládio têm uma maior afinidade pelas células tumorais quando comparadas com as sadias.

A partir de ensaios complementares como migração e morfologia celular foi visto que o composto mais ativo (PdT) frente a linhagem tumoral A549 foi capaz de diminuir a confluência celular, mas não provocou alterações morfológicas significativas, sugerindo um comportamento citostático. Enquanto o composto mais ativo (PdCH<sub>3</sub>) na linhagem tumoral A2780 Cis foi capaz de inibir a migração celular e promover alterações morfológicas característica de

morte celular, indicando que possivelmente o composto atua de maneira citotóxica.

Adicionalmente, ensaios de ciclo celular indicaram que o composto PdCH<sub>3</sub> interferiu no funcionamento base da célula, causando um acúmulo de células na fase sub-G1 do ciclo celular, o que sugere um início do processo de apoptose.

A partir dos resultados oriundos desse trabalho pode-se sugerir um papel ativo do centro metálico para atividade citotóxica. Adicionalmente, o desenvolvimento molecular demonstrou a promissora relação entre a estrutura proposta e a atividade biológica. Portanto esses compostos são pontos de partida promissores para o aprimoramento da seletividade entre células cancerosas e não-cancerosas. Mais estudos são necessários a fim de se chegar a possíveis alvos terapêuticos, no entanto, a elevada ação frente células resistentes instigam esses estudos, bem como um aprofundamento na avaliação do caminho apoptótico.





## Capítulo 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. “Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.” *Quim. Nova*, 28 (1): 118, 2005.
2. CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. “Dissemination and growth of cancer cells in metastatic Sites.” *Nat. Rev. Câncer*, 2 (8): 563, 2002.
3. BACAC, M.; STAMENKOVIC, I. “Metastatic cancer cell.” *Annual review of pathology*, 3: 221, 2008.
4. REYMOND, N.; D’ÁGUA, B.B.; RIDLEY, A.J. “Crossing the endothelial barrier during metastasis.” *Nat Rev Cancer*, 13 (12): 858, 2013.
5. FOLKMAN, J. “Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.” *Oncogene*, 29: 15, 2002.
6. Estimativa 2020 - Apresentação | INCA - Instituto Nacional de Câncer <https://www.inca.gov.br/estimativa> (accessed Set 15, 2021).
7. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2020.
8. ABBAS, Z; REHMAN. S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. In: Hafiz Naveed Shahzad (eds.), *Neoplasm*, 139, 2018.
9. NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. “Complexos de platina (II) na terapia do câncer.” *Rev. Virtual Quim.*, 3 (3): 196, 2011.
10. KHOURY, A.; DEO, K.M.; ALDRICH-WRIGHT. “Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action.” *J. Inorg. Biochem.*, 207:111070, 2020.
11. FADEEL, B.; ORRENIUS, S. “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease.” *J. Intern. Med.*, 258: 479, 2005.
12. PERES, L.A.B.; JÚNIOR, A.D.C. “Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares.” *J.Bras. Nefrol.*, 35 (4): 332, 2013.
13. HOLOHAN C.; SCHAEYBROECK, S.V.; LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Câncer.*, 13 (10): 714, 2013.
14. KOVALA-DEMERTZI D.; BOCCARELLI, A.; DEMERTZIS, M.A.; COLUCCIA, M. In vitro Antitumor Activity of 2-Acetyl Pyridine 4N-Ethyl Thiosemicarbazone and Its Platinum(II) and Palladium(II) Complexes. *Chemotherapy*, 53 (2):148, 2007.
15. BRUNO, M. P.; LIU, Y.; PARK, G. Y.; MURAI, J.; KOCH, E. K.; EISEN, T.J.; PRITCHARD, J.R.; POMMIER, Y.; LIPPARD, S.J.; HEMANN, M.T. A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat. Med.*, 23 (4): 461, 2017.

16. RODGERS, G.E. Química Inorgânica descritiva, de coordenação e do estado sólido. 3.ed., São Paulo-SP: Cengage Learning, 2016.
17. FONTES, A.P.S.; ALMEIDA, S.G.; NADER, L.A. “Compostos de platina em quimioterapia do câncer.” *Quím. Nova*, 20 (4): 398, 1997.
18. JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S. “Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts.” *Chem. Rev.*, 99 (9): 2467, 1999.
19. JONES, C. J. A química dos elementos dos blocos d e f. 1.ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.
20. LAZAREVIC, T.; RILAK, A.; BUGARCIC, Z.D. “Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives.” *Eur. J. Med. Chem.*, 142:8, 2017.
21. ANU, D.; NAVEEN, P.; RATH, N.P.; KAVERI, M.V. “Palladium (II) complexes containing substituted thiosemicarbazones. Synthesis, spectral characterization, X-ray crystallography, biomolecular interactions and in vitro cytotoxicity.” *J. Mol. Struct.*, 1206:127703, 2020.
22. BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova*, 27(3): 461, 2004.
23. JAMAL, S.E.; IQBAL, A.; RAHMAN, K.A.; TAHMEENA, K. “Thiosemicarbazone Complexes as Versatile Medicinal Chemistry Agents: A Review.” *J. drug deliv. ther.*, 9 (3): 689, 2019.
24. TENÓRIO, R.P.; GÓES, A.J.S. “Tiosemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica.” *Quim. Nova*, 28 (6): 1030, 2005.
25. ARORA, S.; AGARWAL, S; SINGHAL, S. “Anticancer activities of thiosemicarbazides/ thiosemicarbazones: A review.” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6 (9): 34,2014.
26. KHAN, T.; AHMAD, R.; JOSHI, S.; KHAN, A.R. “Anticancer potential of metal thiosemicarbazone complexes: A review.” *Pelagia Research Library*, 6(12):1, 2015.
27. TADA, R.; CHAVDA.N.; SHAH, M.K. “Synthesis and characterization of some new thiosemicarbazide derivatives and their transition metal complexes.” *J. Chem. Pharm. Res.*,3(2):290-297,2011.
28. LI, J., LUO, X.; WANG,Q.; ZHENG, L-M.; KING, I.; DOYLE, T.W.; CHEN, S-H. Synthesis and biological evaluation of a water soluble phosphate prodrug of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP). *Bioorg.Med.Chem.Let.*,8 (22): 3159,1998.
29. LIU, M.C; LIN, T.S; SARTORELLI, A.C. Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. *J. Med. Chem.*, 35 (20): 3672,1992.
30. OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.L.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; AMORIM, C.A.C.; CAMPOS, J.F.; RIBEIRO, A.G.; MOURA, R.O.; NEVES, J.L.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; LIMA, M.C.A. “Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities.” *Eur. J. Med. Chem.*,104:148, 2015.

31. MATESANZ, A.I.; JIMENEZ-FARACO, E.; RUIZ, M.C.; BALSAL, L.M.; NAVARRO-RENNINGER, C.; LEÓN, I.E.; QUIROGA, A.G. “Mononuclear Pd(II) and Pt(II) complexes with an  $\alpha$ -N-heterocyclic thiosemicarbazone: cytotoxicity, solution behaviour and interaction versus proven models from the biological media.” *Inorg. Chem.Front.*, 5:73, 2018.
32. HE, Z.; QIAO, H.; YANG, F.; ZHOU, W.; GONG, Y.; ZHANG, X.; WANG, H.; ZHAO, B.; MA, L.; LIU, H-M.; ZHAO, W. “Novel thiosemicarbazone derivatives containing indole fragment as potent and selective anticancer agent.” *Eur. J. Med. Chem.*, 184: 111764, 2019.
33. HUANG, H.; CHEN, Q.; KU, X.; MENG, L.; LIN, L.; WANG, X. ZHU, C.; WANG, Y.; CHEN, Z.; LI, M.; JIANG, H.; CHEN, K.; DING, J.; LIU, H. “A Series of  $\alpha$ -heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones inhibit topoisomerase II $\alpha$  catalytic activity.” *J. Med. Chem.*, 53 (8): 3048, 2010.
34. SHAKYA, B.; YADAV, P.N. “Thiosemicarbazones as Potent Anticancer Agents and their Modes of Action.” *Mini-Reviews in Med. Chem.*, 20: 638, 2020.
35. PELOSI, G. “Thiosemicarbazone metal complexes: From Structure to Activity.” *The Open Crystallography Journal*, 3:16, 2010.
36. DUA, R.; SHRIVASTAVA, S.; SONWANE, S.K.; SRIVASTAVA, S.K. “Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review.” *Adv. Bio. Res.*, 5 (3):120, 2011.
37. MARQUES, K.M.R.; DESTERRO, M.R.; ARRUDA, S.M.; NETO, L.N.A.; LIMA, M.C.A.; ALMEIDA, S.M.V.; SILVA, E.C.D.; AQUINO, T.M.; SILVA-JÚNIOR, E.F.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.F.; SILVA, M.M.; DANTAS, M.D.A.; SANTOS, J.C.C.; FIGUEIREDO, I.M.; BAZIN, M-A.; MARCHAND, P.; SILVA, T.G.; JUNIOR, F.J.B.M.5-“Nitro-thiophene-thiosemicarbazone derivatives present antitumor activity mediated by apoptosis and DNA intercalation.” *Curr. Top. Med. Chem.*, 19 (13): 1075, 2019.
38. ARCHNA; PATHANIA, S.; CHAWLA, P.A. “Thiophene-based derivatives as anticancer agents: An overview on decade’s Work.” *Bioorg Chem.*, 101:104026, 2020.
39. TAVSAN, Z.; YAMAN, P.K.; SUBASI, E.; KAYALI, H.A. “Screening organometallic thiophene containing thiosemicarbazone ruthenium (II/III) complexes as potential anti-tumour agentes.” *JBIC*, 23 (3):425, 2017.
40. NYAWADE, E.A.; SIBUYI, N.R.S.; MEYER, M.; LALANCETTE, R.; ONANI, M.O. “Synthesis, characterization and anticancer activity of new 2-acetyl-5-methyl thiophene and cinnamaldehyde thiosemicarbazones and their palladium(II) Complexes.” *Inorganica Chim. Acta*, 515:120036, 2021.
41. BENITE, A.M.C.; MACHADO, S, P.; BARREIRO, E.J. “Uma visão da química bioinorgânica medicinal.” *Quim.Nova*, 30 (8): 2062, 2007.
42. RAU, T.; VAN ELDIK, R. “Mechanistic insight from kinetic studies on the interaction of model palladium (II) complexes with nucleic acid components.” *Met Ions Biol Syst*, 32:339, 1996.
43. AYYANNAN, G.; VEERASAMY, P.; MOHANRAJ, M.; RAJA, G.; MANIMARAN, A.; VELUSAMY, M.; BHUVANESH, N.;

- NANDHAKUMAR, R.; JAYABALAKRISHNAN, C. "Biological evaluation of organometallic palladium(II) complexes containing 4-hydroxybenzoic acid (3-ethoxy-2-hydroxybenzylidene)hydrazide: Synthesis, structure, DNA/protein binding, antioxidant activity and cytotoxicity." *Appl. Organometal. Chem.* 31 (5): 1, 2016.
44. SOUZA, R.F.F.; CUNHA, G.A.; PEREIRA, J.C.M.; GARCIA, D.M.; BINCOLETTO, C.; GOTO, R.N.; LEOPOLDINO, A.M.; SILVA, I.C.; PAVAN, F.R.; DEFLON, V.M.; ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E.; NETTO, A.V.G. "Orthopalladated acetophenone oxime compounds bearing thioamides as ligands: Synthesis, structure and cytotoxic evaluation." *Inorg. Chim. Acta*, 486: 617, 2019.
45. HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. *Coordination chemistry: reactions, kinetics and mechanisms. Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity.* New York: Harper Collins, 1993.
46. BERNERS-PRICE, S.J.; SADLER, P.J. "Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity." *Bioinorg. Chem.*, 70: 27, 1998.
47. QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A.Z. "Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina." *Quim. Nova*, 19 (6): 651, 1996.
48. HARIBABU, J.; TAMIZH, M.M.; BALACHANDRAN, C.; ARUN, Y.; BHUVANESH, N.S.P.; ENDO, A.; KARVEMBU, R. "Synthesis, structures and mechanistic pathways of anticancer activity of palladium(II) complexes with indole-3-carbaldehyde thiosemicarbazones." *New J. Chem.*, 42: 10818, 2018.
49. OLIVEIRA, C.G.; ROMERO-CANELÓN, I.; SILVA, M.M.; COVERDALE, J.P.C.; MAIA, P.I.S.; BATISTA, A.A.; CASTELLI, S.; DESIDERI, A.; SADLER, P.J.; DEFLON, V.M. "Palladium (II) complexes with thiosemicarbazones derived from pyrene as topoisomerase IB inhibitors." *Dalton Trans.*, 48:16509, 2019.
50. LIMA, M.A.; COSTA, V.A.; FRANCO, M.A.; OLIVEIRA, G.P.; DEFLON, V.M.; ROCHA, F.V. "Palladium(II) complexes bearing thiosemicarbazone and phosphines as inhibitors of DNA-Topoisomerase II enzyme: Synthesis, characterizations and biological studies." *Inorg Chem Commun.*, 112:107708, 2020.
51. HARIBABU, J.; BALACHANDRAN, C.; TAMIZH, M.M.; ARUN, Y.; BHUVANESH, N, S, P.; AOKI, S.; KARVEMBU, R. "Unprecedented formation of palladium(II)-pyrazole based thiourea from chromone thiosemicarbazone and [PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]: Interaction with biomolecules and apoptosis through mitochondrial signaling pathway." *J. Inorg. Biochem.*, 205: 110988, 2020.
52. KALAIVANI, P.; PRABHAKARAN, R.; RAMACHANDRAN, E.; DALLEMER, F.; PARAMAGURU, G.; RENGANATHAN, R.; POORNIMA, P.; PADMA, V.V.; NATARAJAN, K. "Influence of terminal substitution on structural, DNA, protein binding, anticancer and antibacterial activities of

- palladium(II) complexes containing 3-methoxy salicylaldehyde-4(N) substituted thiosemicarbazones.” *Dalton Trans.*, 41: 2486, 2012.
53. CHELLAN, P.; SHUNMOOGAM-GOUNDEN, N. HENDRICKS, D.T.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; LATEGAN, C.; SMITH, P.J.; CHIBALE, K.; SMITH, G.S. “Synthesis, structure and in vitro biological screening of palladium (II) complexes of functionalised salicylaldehyde thiosemicarbazones as antimalarial and anticancer agents.” *Eur. J. Inorg. Chem.*, 22: 3520, 2010.
54. KARAKUÇUK-IYIDOGAN, A. TASDEMIR, D.; ORUÇ-EMRE, E.E.; BALZARINI, J. “Novel platinum (II) and palladium (II) complexes of thiosemicarbazones derived from 5-substituted thiophene-2-carboxaldehydes and their antiviral and cytotoxic activities.” *Eur. J. Med. Chem.*, 46: 5616, 2011.
55. MBUGUA, S.N.; NJENGA, L.W.; ODHIAMBO, R.A.; WANDIGA, S.O.; MEYER, M.; SIBUYI, N.; LALANCETTE, R.A.; ONANI, M.O. “Synthesis, characterization, and DNA-binding kinetics of new Pd(II) and Pt(II) thiosemicarbazone complexes: spectral, structural, and anticancer evaluation.” *J. Chem.*, 46 (11): 5616, 2020.
56. ALI, A.A.; NIMIR, H.; AKTAS, C.; HUCH, V.; RAUCH, U.; SCHAFER, K-H.; VEITH, M. “Organoplatinum(II) Complexes with 2-Acetylthiophene Thiosemicarbazone: Synthesis, Characterization, Crystal Structures, and in Vitro Antitumor Activity.” *Organometallics*, 31: 2256, 2012.
57. LOBANA, T. S. “Activation of C–H bonds of thiosemicarbazones by transition metals: synthesis, structures and importance of cyclometallated compounds.” *RSC*, 5:37231, 2015.
58. WEISS, H.; MOHR, F. “Cyclopalladation of thiophene-substituted thiosemicarbazones.” *J. Organomet. Chem.*, 696:3150, 2011.
59. NETO, J.L.; LIMA, G.M.; BERALDO, H. Platinum and palladium complexes of thiosemicarbazones derived of 2-acetylthiophene: Synthesis and spectral studies. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 63 (3): 669, 2006.
60. LOBANA, T.S.; KUMARI, P.; BUTCHER, R.J.; AKITSU, T.; ARITAKE, Y.; PERLES, J.; FERNANDEZ, F.J.; VEGA, M.C. “Thiosemicarbazones of palladium (II): The presence of methyl/phenyl substituents (R<sub>2</sub>) at C<sub>2</sub> carbon atom induces C-H activation of R<sub>1</sub> rings of thiosemicarbazones {R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>C<sup>2</sup>N<sup>3</sup>-N<sup>2</sup>H-C<sup>1</sup>(S)-N<sup>1</sup>HR<sup>3</sup>}.” *J. Organomet. Chem.*, 701:17, 2012.
61. PAUL, P.; SENGUPTA, P.; BHATTACHARYA, S. “Palladium mediated C-H bond activation of thiosemicarbazones: Catalytic application of organopalladium complexes in C-C and C-N coupling reactions.” *J. Organomet. Chem.*, 724 (24):281, 2013.
62. BARRA, C.V.; NETTO, A.V.G. “Antitumour Complexes and DNA Interactions and their Tools of Analysis: an Approach to Metalintercalators.” *Rev. Virtual Quim.*, 7 (6): 1998, 2015.
63. BOER, D.R.; CANALS, A.; COLL, M. “DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes.” *Dalton Trans.*, 21 (3): 399, 2009.

64. KELLET, A.; MOLPHY, Z.; SLATOR, C.; MCKEE, V.; FARRELL, N.P. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. *Chem. Soc. Rev.*, 48: 971, 2019.
65. BOULIKAS, T.; PANTOS, A.; BELLIS, E.; CHRISTOFIS, P. "Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms." *Cancer Therapy*, 5: 537, 2007.
66. CHAMPOUX, J. J. "DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism." *Annu. Rev. Biochem.*, 70:369, 2001.
67. HANDE, K.R. "Topoisomerase II inhibitors. Update on cancer therapeutics,"3:13, 2008.
68. POMMIER, Y. "Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges." *ACS Chem Biol*, 8 (1): 82, 2013.
69. MCCLENDON A.K.; OSHEROFF, N. "DNA Topoisomerase II, Genotoxicity, and Cancer. Institutes National of health." *Mutat Res.* October 1; 623(1-2): 83, 2007.
70. POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. "DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs." *Chemistry e Biology*,17:421,2010.
71. LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. "Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy." *Pharmacology e Therapeutics*, 99 (2): 167, 2003.
72. JAIN, C.K.; MAJUMDER, H.K.; ROYCHOUDHURY, S. "Natural compounds as anticancer agentes targeting DNA topoisomerase." *Current Genomics*, 18:75, 2017.
73. HENEVER, K.E.; VERSTAK, T.A.; LUTAT, K.E.; RIGGSBEE, D.L.; MOONEV, J.W. "Recent developments in topoisomerase targeted cancer chemotherapy." *Acta Pharm Sin B*, 2018.
74. NITTISJ.L. "Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy." *Nat. Rev. Cancer*, 9 (5):338, 2009.
75. ICSEL, C.; YILMAZ, V.T.; AYGUN, M.; ULUKAYA, E. "Trans-Pd/Pt(II) saccharinate complexes with a phosphine ligand: Synthesis, cytotoxicity and structure-activity relationship." *Bioorg Med Chem Lett*,30 (9): 127077, 2020.
76. GUNATILLEKE, S. S.; OLIVEIRA, C.A.F.; MCCAMMON, J.A.; BARRIOS, A.M. "Inhibition of cathepsin B by Au(I) complexes: a kinetic and computational study." *J. Biol. Inorg. Chem.*,13 (4):555, 2008.
77. GIANFERRARA, T.; BRATSOS, I; ALESSIO, E. A. Categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. *Dalton Trans.*, 37:7588, 2009.
78. PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. Purification of laboratory chemicals. 3.ed., New York: Pergamon Press, 1988.
79. DU, X.; GUO,C.;HANSELL,E.;DOYLE,P.S.;CAFFREY,C.R.; HOLLER,T.P.;MCKERROW,J.H.;COHEN,F.E. "Synthesis and structure – activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain." *J Med Chem.*, 45(13): 2695, 2002.

80. ROCHA, F.V. Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral de complexos de paládio (II) com ligantes sulfurados e trifenilfosfina. Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2013. Tese de doutorado, 145 p.
81. OLIVEIRA, C.G. Síntese, caracterização e estudo de mecanismo de ação de complexos de paládio e platina com ligantes tiossemicarbazonas derivados do pireno visando a obtenção de novos quimioterápicos anticâncer. São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, 2018. Tese de doutorado, 194 p.
82. RUIZ, J.; CUTILLAS, N.; VILLA, M.D.; LÓPEZ, G.; ESPINOSA, A.; BAUTISTA, D. N1- “Coordination in palladium (II) and platinum (II) complexes with 9 – methylpoxanthine: crystal structures and theoretical calculations.” *Dalton Trans.*, 9637, 2009.
83. COLINA-VEGAS, L.; VILLARREAL, W.; NAVARRO, M.; OLIVEIRA, C.R.; GRAMINHA, A.E.; MAIA, P.I.S.; DEFLON, V.M.; FERREIRA, A.G.; COMINETTI, M.R.; BATISTA, A.A. “Cytotoxicity of Ru(II) Piano-Stool Complexes with Chloroquine and Chelating Ligands against Breast and Lung Tumor Cells: Interactions with DNA and BSA.” *J. Inorg. Biochem.*, 153:150, 2015.
84. POPOLIN, C.P.; REIS, J.P.B.; BECCENERI, A.M.; GRAMINHA, A.E.; ALMEIDA, M.A.P.; CORREA, R.S.; COLINA-VEGAS, L.A.; ELLENA, J.; BATISTA, A.A.; COMINETTI, M.R. “Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells.” *Plos One*, 12 (9):1, 2017.
85. WOLFE, A.; SHIMER, G. H. J.; MEEHAN, T. “Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA” *Biochem.*, 26 (20): 6392, 1987.
86. VILLAREAL, W.; COLINA-VEGAS, L.; VISBAL, G.; CORONA, O.; CORREA, R.S.; ELLENA, J.; COMINETTI, M.R.; BATISTA, A.A.; NAVARRO, M. “Copper(I)–Phosphine Polypyridyl Complexes Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity.” *Inorg. Chem. Front.*, 56:3781, 2017.
87. CENSI, V.; CABALLERO, A.B.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; SOTO-CERRATO, V.; KORRODI-GREGÓRIO, L.; PÉREZ-TOMÁS, R.; DELL’ANNA, M.M.; MASTRORILLI, P.; GAMEZ, P. “DNA-binding and in vitro cytotoxic activity of platinum(II) complexes of curcumin and caffeine.” *J. Inorg. Biochem.* 198:110749, 2019.
88. INCI, D.; AYDIN, R.; VATAN, O.; ZORLU, Y.; ÇINKILIÇ, N. “New binary copper(II) complexes containing intercalating ligands: DNA interactions, an unusual static quenching mechanism of BSA and cytotoxic activities.” *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36:3878, 2018.
89. RUIZ, J.; VICENTE, C.; HARO, C.; BAUTISTA, D. “Novel bis-C,N-cyclometalated iridium(III) thiosemicarbazide antitumor complexes: Interactions with human serum albumin and DNA, and inhibition of cathepsin B.” *Inorg. Chem.*, 52 (2): 974, 2013.

90. STEWART, J.J.P. "Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters." *J Mol Model*, 19 (1): 1, 2013.
91. Z, L.; J.G.; H, Z. "Adaptive molecular docking method based on information entropy genetic algorithm." *Appl. Soft Comput.*, 26:299, 2015.
92. ROCHA, F.V.; FARIAS, R.L.; LIMA, M.A.; BATISTA, V.S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M.; GARRIDO, S.S.; LEOPOLDINO, A.M.; GOTO, R.N.; OLIVEIRA, A.B.; BECK, J.; LANDVOGT, C.; MAURO, A.E.; NETTO, A.V.G. "Computational studies, design and synthesis of Pd(II)-based complexes: Allosteric inhibitors of the Human Topoisomerase-II $\alpha$ ." *J. Inorg. Biochem.*, 199:110725, 2019.
93. BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. "Molecular Modeling, Docking and ADMET of Dimethylthiohydantoin Derivatives for Prostate Cancer Treatment." *Nucleic Acids Research*, 28 (1): 235, 2000.
94. SINGH, P.K.; SILAKARI, O. "Concepts and Experimental Protocols of Modelling and Informatics in Drug Design." Academic Press, 131, 2020.
95. D. S. BIOVIA, Journal, Visualizer, 2020.
96. MACÊDO, A. P. M. G. Desenvolvimento de Potenciais Metalofármacos de Rutênio Contendo 1,1'-Bis(Difenilfosfina)Ferroceno e Ligantes Mercapto. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2019. Tese de doutorado, 200 p.
97. CUNHA, B. N. Avaliação das Propriedades Química e Citotóxicas de Novos Compostos Organometálicos de Ru(II) com Aciltioureas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2018. Tese de doutorado, 227 p.
98. VELHO, R. G. Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Dissertação de mestrado, 170 p.
99. SEN, B.; KALHAN, H.K.; DEMIR, V.; GULER, E.E.; KAYALI, H.A.; SUBASI, E. "Crystal structures, spectroscopic properties of new cobalt(II), nickel(II), zinc (II) and palladium(II) complexes derived from 2-acetyl-5-chloro thiophene thiosemicarbazone: Anticancer evaluation." *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 98: 550, 2019.
100. LOBANA, T.S.; SHARMA, R.; BAWA, G.; KHANNA, S. "Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—An overview." *Coord. Chem. Rev.*, 253:977, 2009.
101. KNUPP, V.F.; NICESIO, I.C.; QUEIROZ, F.M.; MATOS, R.M.; PASSOS, B.F.T. "Síntese e caracterização estrutural de complexos mono e bimetálicos de paládio e platina com ligantes contendo nitrogênio e enxofre." *Quim. Nova*, 20 (4), 1997.
102. MAIA, P.I.S.; GRAMINHA, A.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; BATISTA, A.A.; BACK, D.F.; LANG, E.S.; ELLENA, J.; LEMOS, S.S.;



- SALISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; DEFLON, V.M. "Palladium(II) Complexes with Thiosemicarbazones. Syntheses, Characterization and Cytotoxicity against Breast Cancer Cells and Anti-Mycobacterium tuberculosis Activity." *J. Braz. Chem. Soc.*, 21 (7): 1177, 2010.
103. LOBANA, T.S.; BAWA, G.; HUNDAL, G.; PANNU, A.P.S.; BUTCHER, R.J.; LIAW, B.-J.; LIU, C.W. "The influence of substituents (R) at the C2 carbon on bonding properties of thiosemicarbazones {RC<sub>2</sub>(H)@N<sub>3</sub>-N<sub>2</sub>H-C<sub>1</sub>(@S)-N<sub>1</sub>H<sub>2</sub>} in palladium(II) complexes." *Polyhedron*, 26:4993, 2007.
104. FULMER, G.R.; MILLER, A.J.M.; SHERDEN, N.H.; GOTTLIEB, H.E.; NUDELMAN, A.; STOLTZ, B.M.; BERCAW, J.E.; GOLDBERG, K.I. "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist." *Organometallics*, 29:2176, 2010.
105. PEÑA, W. J.V. Síntese e caracterização de complexos de platina (II) com ligandos fosfínicos e cloroquina: estudo de suas interações com o DNA e avaliação de suas atividades citotóxicas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2013. Dissertação de mestrado, 119 p.
106. SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. *Química Inorgânica*. 4.ed., Porto Alegre: Bookman, 2008.
107. YAMAN, P.K.; SEN, B.; KARAGOZ, C.S.; SUBASI, E. "Half-sandwich ruthenium-arene complexes with thiophen containing thiosemicarbazones: Synthesis and structural Characterization." *J. Organomet. Chem.*, 832, 2017.
108. UNVER, Y.; SANCAK, K.; ÇELIK, F.; BIRINCI, E.; KUÇUK, M.; SOYLU, S.; BURNAZ, N.A. New thiophene-1,2,4-triazole-5(3)-ones: Highly bioactive thiosemicarbazides, structures of Schiff bases and triazole-thiols. *Eur. J. Med. Chem.*, 84:639, 2014.
109. ALOMAR, K.; KHAN, M.A.; ALLAIN, M.; BOUET, G. Synthesis, Crystal structure and characterization of 3-thiophene aldehyde thiosemicarbazone and its complexes with cobalto (II), nickel (II) and copper (II). *Polyhedron*, 28:1273. 2009.
110. CASAS, J.S. CASTELLANO, E.E.; ELLENA, J.; GARCIA-TASENDE, M.S.; PÉREZ-PARALLÉ, M.L.; SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, A.; SORDO, J.; TOUCEDA, A. "New Pd(II) and Pt(II) complexes with N,S-chelated pyrazolonate ligands: Molecular and supramolecular structure and preliminary study of their in vitro antitumoral activity." *J. Inorg. Biochem.*, 102 (1): 33, 2008.
111. NETO, J.H.A. Complexos Semi-Sanduíche de RuII/Areno e Produtos Naturais: Uma Promissora Combinação para Novos Metalofármacos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2020. Tese de doutorado, 272 p.
112. BATSANOV, S.S. "Van der Waals radii of elements." *Inorg. Mater.*, 37 (9): 1031, 2001.
113. STEINER, T. "The Hydrogen Bond in the Solid State." *Angew. Chem.Int.*, 41:48, 2002.

114. RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. “Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição.” *Braz. J. Pharm. Sci.*, 42 (1), 2006.
115. JAKUBOWSKI, M.; LAKOMSKA, I.; SITKOWSKI, J.; WISNIEWSKA, J. “Dicarboxylato platinum (II) complexes containing dimethyl sulfoxide and triazolopyrimidine as potential anticancer agents: synthesis, structural and biological studies in solution.” *New J. Chem.*, 42:8113, 2012.
116. SANTOS, V.L.A.; GONSALVES, A.A.; ARAUJO, C.R.M. “Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico.” *Quim. Nova*, 41(1): 110, 2018.
117. HIRADE, T.; OKUI, Y.; HAN, M. “A design strategy for stable light-sensitive palladium complexes.” *J. Mater. Chem.C.*, 15(1): 2672, 2013.
118. SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. “Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry.” *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 124:1, 2013.
119. BARRA, C.V.; ROCHA, F.V.; MOREL, L.; GAUTIER, A.; GARRIDO, S.S.; MAURO, A.E.; FREM, R.C.G.; NETTO, A.V.G. “DNA binding, topoisomerase inhibition and cytotoxicity of palladium(II) complexes with 1,10-phenanthroline and thioureas,” *Inorg. Chim. Acta.*, 446:54, 2016.
120. GAO, E.; LIU, F.; ZHU, M.; WANG, L.; HUANG, Y.; LIU, H.; MA, S.; SHI, Q.; WANG, N. “Synthesis, characterization, DNA interaction, and cytotoxicity of novel Pd(II) and Pt(II) complexes.” *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 25(4): 557, 2010.
121. BISWA, S. N.; SAHA, S.; KHANRA, S.; SARKAR, A.; MANDAL, D.P.; BHATTACHARJEE, S.; CHAUDHURI, A.; CHAKRABORTY, S.; CHOUDHURY, C.R. “Example of two novel thiocyanato bridged copper (II) complexes derived from substituted thiosemicarbazone ligand: structural elucidation, DNA/albumin binding, biological profile analysis, and molecular docking study.” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 37 (11): 2801, 2019.
122. SILVA, E.F. Análise de complexos DNA-ligantes com aplicações na construção de carreadores de fármacos. Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 2008. Tese de doutorado, 119 p.
123. BATISTA, J. A. D. Estudo do encapsulamento de compostos DNA fármacos por um polipeptídeo recombinante. Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 2017. Dissertação de mestrado, 41 p.
124. RIBEIRO, G.H. Complexos fosfínicos de rutênio contendo o ligante 2,2'-dipiridilamina: síntese, caracterização e avaliação de suas atividades citotóxicas e de interação com DNA. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2016. Dissertação de mestrado, 127 p.
125. VILLARREAL, W.; COLINA-VEGAS, L.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, C.; TENORIO, J.C.; ELLENA, J.; GOZZO, F.C.; COMINETTI, M.R.;

- FERREIRA, A.G.; FERREIRA, M.A.; NAVARRO, M. & BATISTA, A.A. "Chiral Platinum(II) Complexes Featuring Phosphine and Chloroquine Ligands as Cytotoxic and Monofunctional DNA-Binding Agents." *Inorg. Chem.*, 54 (24): 11709, 2015.
126. FU, X-B.; LIU, D-D.; LIN, Y.; HU, W.; MAO, Z-W. & LE, X-Y. "Water-soluble DNA minor groove binders as potential chemotherapeutic agents: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation, cytotoxicity and HSA interactions." *Dalton trans.*, 43 (23): 8721, 2014.
127. INDUMATHY, R.; RADHIKA, S.; KANTHIMATHI, M.; WEYHERMULLER, T. & UNNI NAIR, B. "Cobalt complexes of terpyridine ligand: crystal structure and photocleavage of DNA." *Journal of inorganic biochemistry*, 101 (3): 434, 2007.
128. Cunha, B. N. *et al.* Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation. *Inorg. Chem.* 59:5072, 2020.
129. GARBETT, N.C.; RAGAZZON, P.A.; CHAIRES, J.B. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. *Nat. Protoc.*, 2 (12): 3166, 2007.
130. CHEN, L-M.; LIU, J.; CHEN, J-C.; SHI, S.; TAN, C-P.; ZHENG, K-C.; JI, L-N. "Experimental and theoretical studies on the DNA binding and spectral properties of water-soluble complex [Ru(MeIm)<sub>4</sub>(dpq)]<sup>2+</sup>." *J. Mol. Struct.*, 881 (1-3): 156, 2007.
131. REHMAN, S.U.; SARWAR, T.; HUSAIN, M.A.; ISHQUI, H.M.; TABISH, M. "Studying non-covalent drug-DNA interactions." *Arch. Biochem. Biophys.* 576:49, 2015.
132. RIBEIRO, A.G.; ALMEIDA, S.M.V.; OLIVEIRA, J.F.; SOUZA, T.R.C.L.; SANTOS, K.L.; ALBUQUERQUE, A.P.B.; NOGUEIRA, M.C.B.L.; JUNIOR, L.B.C.; MOURA, R.O.; SILVA, A.C.; PEREIRA, V.R.A.; CASTRO, M.C.A.B.; LIMA, M.C.A. "Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, in vitro and in silico biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition." *Eur. J. Med. Chem.*, 182:111592, 2019.
133. CUNHA, G.A.; SOUZA, R.F.F.; FARIAS, R.L.; MOREIRA, M.B.; SILVA, D.E.S.; ZANETTI, R.D.; GARCIA, D.M.; SPINDOLA, D.G.; MICHELIN, L.F.G.; BINCOLLETO, C.; SOUZA, A.A.; ANTUNES, A.A.; JUDICE, W.A.S.; LEITAO, R.C.F.; DEFLON, V.M.; MAURO, A.E.; NETTO, A.V.G.; "Cyclopalladated compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, spectral and biological studies." *J. Inorg. Biochem.*, 203:110944, 2020.
134. WEI, Y.; GUO, L-H. "Binding Interaction between Polycyclic Aromatic Compounds and DNA by Fluorescence Displacement Method." *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 940, 2009.
135. STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutat. Res.*, 623(1-2):3-13, 2007.

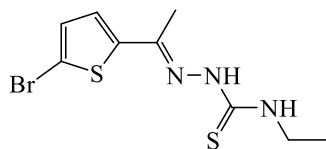
136. PEBERDY, J.C.; MALINA, J.; KHALID, S.; HANNON, M.J.; RODGER, A. Influence of surface shape on DNA binding of bimetallo helicates. *J. Inorg. Biochem.*, 101 (11-12):1937, 2007.
137. COUMAR, M.S. *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design: Fundamentals, techniques, resources and applications*. Academic Press, 2021.
138. RAMASWAMY, A.; BALASUBRAMANIAN, S.; RAJAGOPALAN, M.; A theoretical revisit on molecular modeling and Docking approaches. Academic Press, 2021.
139. FARIAS, R.L.; POLEZ, A.M.R.; SILVA, D.E.S.; ZANETTI, R.D.; MOREIRA, M.B.; BATISTA, V.S.; REIS, B.L.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M.; ROCHA, F.V.; LIMA, M.A.; OLIVEIRA, A.B.; ELLENA, J.; SCARIM, C.B.; ZAMBOM, C.R.; BRITO, L.D.; GARRIDO, S.S.; MELO, A.P.L.; BRESOLIN, L.; TIRLONI, B.; PEREIRA, J.C.M.; NETTO, A.V.G. "In vitro and in silico assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on Ni (II) bearing K<sup>2</sup> N,S-donor ligands." *Mater. Sci. Eng. C*, 121: 111815, 2021.
140. DREW, H.R.; WING, R.M.; TAKANO, T.; BROKA, C.; TANAKA, S.; ITAKURA, K.; DICKERSON, R.E. "Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 2179, 1981.
141. FUERTES, M.A.; CEPEDA, V.; ALONSO, C.; PÉREZ, J.M. Molecular Mechanisms for the B-Z Transition in the Example of Poly[d(G-C),d(G-C)] Polymers. A Critical Review. *Chem. Rev.*, 106:2045, 2006.
142. LOONTIENS, F.G.; REGENFUSS, P.; ZECHEL, A.; DUMORTIER, L.; CLEGG, R.M. "Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly [D(A-T)], and D(CCGGAATTCGG): multiple stoichiometries." *Biochemistry*, 29 (38): 9029, 1990.
143. MOORTHY, N.S.H.N.; SOUSA, S.F.; RAMOS, M.J.; FERNANDES, P.A. "Molecular dynamic simulations and structure-based pharmacophore development for farnesyltransferase inhibitors discovery." *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 31:1428, 2016.
144. GANOT, N.; MEKER, S.; REYTMAN, L.; TZUBERY, A.; TSHUVA, E.Y. "Anticancer Metal Complexes: Synthesis and Cytotoxicity Evaluation by the MTT Assay." *JoVE*, 81: 50767, 2013.
145. HUANG, Z.; YU, P.; TANG, J. "Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model." *Oncotargets and Therapy*, 13: 5395, 2020.
146. VAIDYANATHAN, A.; SAWERS, L.; CHAKRAVARTY, P.; BRAY, S.E.; MCMULLEN, K.W.; FERGUSON, M.J.; SMITH, G. "Identification of novel targetable resistance mechanisms and candidate clinical response

- biomarkers in drug-resistant ovarian cancer, following single-agent and combination chemotherapy.” *Clinical Cancer Research*, 24, 2018.
147. ALMEIDA, V.M.; JR, M.A.B.; NASCIMENTO, J.C.; AMORIM, L.M.F. “Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura *in vitro*.” *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 55(6): 606, 2019.
148. ARNEDO-SUAREZ, A.; FIGUEROA, F.T.; CLAVIJO, C.; ARBELÁEZ, P.; CRUZ, J.C. “An image J plugin for the high throughput image analysis of *in vitro* scratch wound healing assays.” *PLOS ONE*, 15 (7), 2020.
149. MILLAR, A.W.; LYNCH, K.P. “Rethinking clinical trials for cytostatic drugs.” *Nat. Rev. Cancer*, 3 (7): 540, 2003.
150. CUNHA, B.N.; COLINA-VEGAS, L.; PLUTÍN, A.M.; SILVEIRA, R.G.; HONORATO, J.; OLIVEIRA, K.M.; COMINETTI, M.R.; FERREIRA, A.G.; CASTELLANO, E.E.; BATISTA, A.A. “Hydrolysis reaction promotes changes in coordination mode of Ru(II)/acylthiourea organometallic complexes with cytotoxicity against human lung tumor cell lines.” *J. Inorg. Biochem.*, 186:147, 2018.
151. OLIVEIRA, T.D. Estudo de complexos metálicos de RuII, NiII, PdII e PtII com ligantes aciltioureas: Atividade citotóxica e interação com biomoléculas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2019. Tese de doutorado, 198 p.
152. BRASELMANN, H. et al. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiat Oncol*, 10:223, 2015.
153. FOSTER, I. “Cancer: A cell cycle defect.” *Radiography.*, 14 (2): 144, 2008.
154. KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. “The Nature of Cell-Cycle Checkpoints: Facts and Fallacies.” *J. Biol.*, 8 (10): 88, 2009.
155. HELD, P. Monitoring Cell Cycle Progression in Cancer Cells, Using Nuclear Staining to Assess Cellular DNA Content. Laboratory Manager, Applications Department, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, 2018.
156. HUANG, X.; HALICKA, H. D.; TRAGANOS, F.; TANAKA, T.; KUROSE, A.; DARZYNKIEWICZ, Z. “Cytometric Assessment of DNA Damage in Relation to Cell Cycle Phase and Apoptosis.” *Cell Prolif.*, 38 (4): 223, 2005.

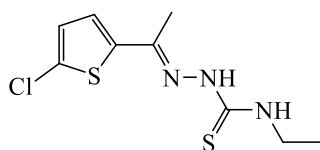


## Capítulo 7 - APÊNDICES

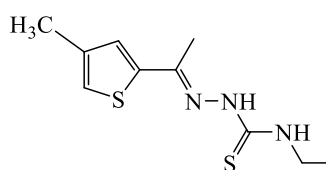
### 7.1 – Caracterizações



BRET: Cor: amarelo, rendimento de 92,34 %. P.F: 172-174°. Anal. Cal. (%) para  $C_9H_{12}BrN_3S_2$ : C 35,30; H 3,95; N 13,72, encontrado C 35,79; H 3,96; N 13,95. IR (ICS, bandas selecionadas,  $cm^{-1}$ ): 1536  $\nu(C=N)$ ; 808  $\nu(C=S)$ ; 3105  $\nu(N-H)$ ; 1083  $\nu(N-N)$ ; 1307  $\nu(C-N)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} M^{-1}$ , DMSO): 257 (69100), 343 (25500).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,64 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 6,99 (q,  $J = 3,9$  Hz, 2H), 3,73 (p,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 2,21 (s, 3H), 1,30 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  177,29, 143,95, 141,60, 130,45, 127,30, 115,74, 39,53, 14,38, 13,09. MS  $[M-H]^+$ : Calculado: 304,9656, encontrado: 304,3000.

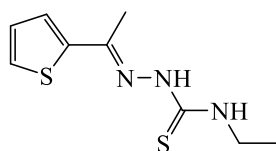


CLET: Cor: amarelo, rendimento de 87,35%. P.F: 144-147°. Anal. Cal. (%) para  $C_9H_{12}ClN_3S_2$ : C 41,29; H 4,62; N 16,05, encontrado C 41,09; H 4,79; N 16,04. IR (ICS, bandas selecionadas,  $cm^{-1}$ ): 1536  $\nu(C=N)$ ; 812  $\nu(C=S)$ ; 3106  $\nu(N-H)$ ; 1085  $\nu(N-N)$ ; 1309  $\nu(C-N)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} M^{-1}$ , DMSO): 257 (68900), 342 (27100).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,63 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,03 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 6,83 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 3,73 (p,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 2,20 (s, 3H), 1,30 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  177,30, 141,73, 141,07, 132,96, 126,73, 126,51, 39,53, 14,37, 12,95. MS  $[M-H]^+$ : Calculado: 261.0161, encontrado: 262.0233.

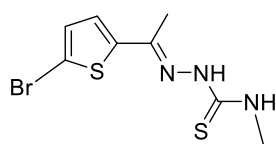


MET: Cor: amarelo, rendimento de 75,89%. P.F: 145-148°. Anal. Cal. (%) para  $C_{10}H_{15}N_3S_2$ : C 49,76; H 6,26; N 17,41, encontrado C 49,15; H 5,83; N 17,65. IR (ICS, bandas selecionadas,  $cm^{-1}$ ): 1526  $\nu(C=N)$ ; 810  $\nu(C=S)$ ; 3209  $\nu(N-H)$ ; 1086  $\nu(N-N)$ ; 1297  $\nu(C-N)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} M^{-1}$ , DMSO): 265 (61100), 336 (27900).  $^1H$

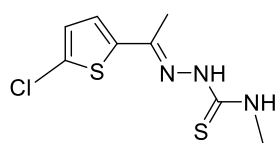
NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,60 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,75 (p, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,25 (d, *J* = 4,1 Hz, 6H), 1,31 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177,29, 142,52, 142,15, 138,18, 129,63, 123,48, 39,47, 15,76, 14,41, 13,69. MS [M-H]<sup>+</sup>: Calculado: 241,0707, encontrado: 242,0781.



TET: Cor: amarelo, rendimento de 84,03%. P.F: 114-117°. Anal. Cal. (%) para C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>: C 47,55; H 5,76; N 18,48, encontrado C 47,98; H 5,38; N 18,83. IR (ICS, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1539 ν(C=N); 815 ν(C=S); 3203 ν(N-H); 1100 ν(N-N); 1294 ν(C-N). UV-VIS (1x10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup>, DMSO): 257 (63600), 333 (27000). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,64 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,34 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,29 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 7,04 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 3,76 (p, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,31 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177,35, 142,60, 128,07, 127,60, 127,33, 39,48, 14,41, 13,81. MS [M-H]<sup>+</sup>: Calculado: 227,0551, encontrado: 228,0623.



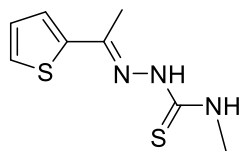
BRMT: Cor: amarelo, rendimento de 95,07%. P.F: 205-208°. Anal. Cal. (%) para C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>3</sub>S<sub>2</sub>.0,5H<sub>2</sub>O: C 32,88; H 3,45; N 14,38, encontrado C 32,88; H 3,45; N 14,38. UV-VIS (1x10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup>, DMSO): 258 (65000), 343 (26800). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,37 (s, 1H), 8,16 – 8,04 (m, 1H), 7,33 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H), 7,21 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H), 3,03 (d, *J* = 4,3 Hz, 3H), 2,28 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 178,77, 145,12, 144,19, 131,38, 128,80, 114,70, 31,65, 14,42.



CLMT: Cor: amarelo, rendimento de 89,09%. P.F: 185-186°. Anal. Cal. (%) para C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>S<sub>2</sub>.0,5H<sub>2</sub>O: C 38,78; H 4,07; N 16,96, encontrado C 38,78; H 4,07; N 16,96. IR (ICS, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1653 ν(C=N); 804 ν(C=S); 3097 ν(N-H); 1014 ν(N-N); 1287 ν(C-N). UV-VIS



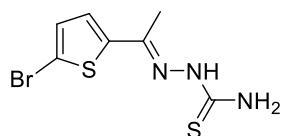
( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 266 (12700), 291 (15000).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178,45, 141,81, 140,99, 133,01, 126,72, 126,56, 31,39, 12,92.



TMT: Cor: amarelo, rendimento de 78,11%. P.F: 124-126°.

Anal. Cal. (%) para  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ : C 45,04; H 5,20; N 19,70, encontrado C 45,04; H 5,20; N 19,70. IR (ICS, bandas

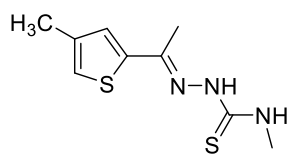
selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1558  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 817  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 3241  $\nu(\text{N}-\text{H})$ ; 1058  $\nu(\text{N}-\text{N})$ ; 1302  $\nu(\text{C}-\text{N})$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 258 (12000), 335 (20800).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  10,30 (s, 1H), 8,07 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 7,60 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 7,53 (d,  $J = 3,5$  Hz, 1H), 7,09 (t,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 3,04 (d,  $J = 4,5$  Hz, 3H), 2,33 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  178,83, 145,20, 143,29, 128,35, 128,18, 31,58, 15,29.



BRT: Cor: amarelo, rendimento de 84,43%. P.F: 200-203°.

IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1602  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 785  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 3152  $\nu(\text{N}-\text{H})$ ; 1104  $\nu(\text{N}-\text{N})$ ; 1295  $\nu(\text{C}-\text{N})$ . UV-VIS

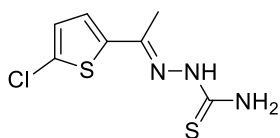
( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 259 (62900), 343 (32400).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  10,40 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 2,29 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  179,04, 145,10, 144,46, 131,44, 128,98, 114,88, 14,42.



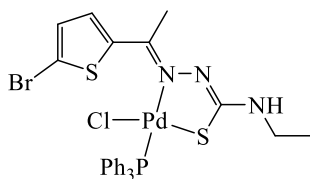
MMT: Cor: amarelo, rendimento de 91,25%. P.F: 177-179°.

IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1544  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 815  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 3259  $\nu(\text{N}-\text{H})$ ; 1099  $\nu(\text{N}-\text{N})$ ; 1296  $\nu(\text{C}-\text{N})$ . UV-VIS

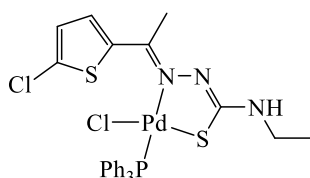
( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 261 (58900), 336 (23100).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,65 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,25 (d,  $J = 4,9$  Hz, 3H), 2,25 (d,  $J = 3,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178,43, 142,65, 142,07, 138,17, 129,70, 123,52, 31,33, 15,76, 13,71.



CLT: Cor: amarelo, rendimento de 95,47%. P.F: 179-180°. IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1597  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 784  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 3233  $\nu(\text{N-H})$ ; 1110  $\nu(\text{N-N})$ ; 1296  $\nu(\text{C-N})$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 258 (66800), 342 (41000).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,91 (s, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,08 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 6,86 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 6,62 (s, 1H), 2,25 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178,76, 143,27, 140,70, 133,56, 127,07, 126,77, 13,12.

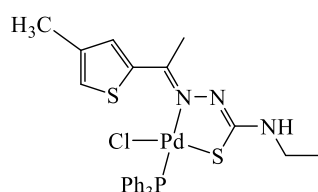


[PdCl(BRET)PPh<sub>3</sub>] (PdBr): Cor: laranja, rendimento de 71,61%. P.F: 221-224°. Condutividade molar ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 2,63 S  $\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . Anal. Cal. (%) para  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{BrClN}_3\text{PPdS}_2$ : C 45,71; H 3,69; N 5,92, encontrado C 46,38; H 3,68; N 6,37. IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1554  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 746  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 1071  $\nu(\text{N-N})$ ; 1318  $\nu(\text{C-N})$ ; 344  $\nu(\text{Pd-Cl})$ ; 510  $\nu(\text{Pd-S})$ ; 534  $\nu(\text{Pd-N})$ ; 1098  $\nu(\text{P-Ph}_3)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 259 (78900), 370 (23700).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,77 (dd,  $J = 11,8, 7,4$  Hz, 6H), 7,51 – 7,38 (m, 9H), 7,31 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 7,04 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 4,55 (t,  $J = 4,6$  Hz, 1H), 3,45 (p,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 3,10 (s, 3H), 1,21 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28,17.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168,35, 156,08, 135,67, 134,47, 131,13, 130,64, 130,20, 129,64, 128,35, 128,24, 123,34, 41,18, 25,00, 14,66. MS  $[\text{M-H}]^+$ : Calculado: 706,9212, encontrado: 706,9292.



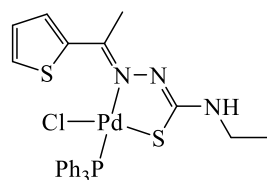
[PdCl(CLET)PPh<sub>3</sub>] (PdCl): Cor: laranja, rendimento de 52,39%. P.F: 144-147°. Condutividade molar ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 1,07 S  $\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . Anal. Cal. (%) para  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{PPdS}_2$ : C 48,77; H 3,94; N 6,32, encontrado C 49,18; H 3,96; N 6,98. IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1562  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 745  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 1073  $\nu(\text{N-N})$ ; 1322  $\nu(\text{C-N})$ ; 339  $\nu(\text{Pd-Cl})$ ; 513  $\nu(\text{Pd-S})$ ; 534  $\nu(\text{Pd-N})$ ; 1097  $\nu(\text{P-Ph}_3)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 259 (73800), 369 (20400).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,77 (dd,  $J = 12,0, 7,8$  Hz, 6H), 7,45 (dq,  $J = 14,3, 8,1$  Hz,

9H), 7,36 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 6,91 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 4,54 (t,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 3,45 (p,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,09 (s, 3H), 1,21 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.17.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168,42, 156,18, 138,90, 134,58, 134,47, 132,71, 132,65, 131,12, 130,20, 130,06, 129,64, 128,35, 128,24, 124,58, 41,19, 24,98, 14,64. MS  $[\text{M}-\text{H}]^+$ : Calculado: 662,9718, encontrado: 662,9807.



$[\text{PdCl}(\text{MTET})\text{PPh}_3]$  ( $\text{PdCH}_3$ ): Cor: laranja, rendimento de 62,78%. P.F: 180-183°. Condutividade molar ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 0,98  $\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . Anal. Cal. (%) para

$\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{ClN}_3\text{PPdS}_2$ : C 52,18; H 4,54; N 6,52, encontrado C 52,84; H 4,47; N 6,74. IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1570  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 750  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 1076  $\nu(\text{N}-\text{N})$ ; 1307  $\nu(\text{C}-\text{N})$ ; 334  $\nu(\text{Pd}-\text{Cl})$ ; 509  $\nu(\text{Pd}-\text{S})$ ; 532  $\nu(\text{Pd}-\text{N})$ ; 1102  $\nu(\text{P}-\text{Ph}_3)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 260 (72300), 362 (20700).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,77 (dd,  $J = 12,0$ , 7,8 Hz, 6H), 7,43 (tt,  $J = 16,1$ , 7,9 Hz, 10H), 7,15 (s, 1H), 4,42 (t,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 3,46 (p,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,12 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 1,18 (s, 3H).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  27,99.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,69, 156,82, 135,77, 134,60, 134,49, 133,45, 131,07, 131,04, 130,39, 130,36, 129,81, 128,32, 128,21, 41,14, 26,17, 15,61, 14,65. MS  $[\text{M}-\text{H}]^+$ : Calculado: 643,0264, encontrado: 643,0357.

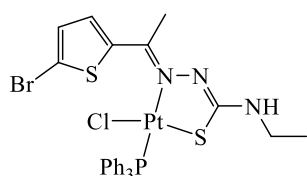


$[\text{PdCl}(\text{TET})\text{PPh}_3]$  ( $\text{PdT}$ ): Cor: laranja, rendimento de 72,51%.

P.F: 226-229°. Condutividade molar ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 4,54  $\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . Anal. Cal. (%) para  $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{ClN}_3\text{PPdS}_2$ : C 51,44; H 4,32; N 6,66, encontrado C 51,74; H 4,17; N 7,02. IR

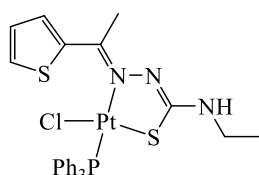
(ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1557  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 764  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 1076  $\nu(\text{N}-\text{N})$ ; 1311  $\nu(\text{C}-\text{N})$ ; 338  $\nu(\text{Pd}-\text{Cl})$ ; 522  $\nu(\text{Pd}-\text{S})$ ; 536  $\nu(\text{Pd}-\text{N})$ ; 1096  $\nu(\text{P}-\text{Ph}_3)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 260 (76300), 361 (21800).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,78

(dd,  $J = 12,0, 7,9$  Hz, 6H), 7,60 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 7,56 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1H), 7,51 – 7,39 (m, 9H), 7,07 (t,  $J = 4,5$  Hz, 1H), 4,46 (t,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 3,48 (p,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,16 (s, 3H), 1,19 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28,05.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,82, 156,92, 134,60, 134,49, 133,98, 131,33, 131,06, 130,33, 129,78, 128,32, 128,21, 125,37, 41,17, 26,21, 14,63. MS  $[\text{M-H}]^+$ : Calculado: 629,0107, encontrado: 629,0193.



$[\text{PtCl}(\text{BRET})\text{PPh}_3]$  (PtBr): Cor: rosa, rendimento de 71,26%. P.F: decompõe 219-222°. Condutividade molar ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 1,11  $\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . Anal. Cal. (%) para  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{BrClN}_3\text{PPtS}_2$ : C 40,64; H 3,28; N 5,27, encontrado

C 41,07; H 3,46; N 5,08. IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1505  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 758  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 1028  $\nu(\text{N}-\text{N})$ ; 1394  $\nu(\text{C}-\text{N})$ ; 340  $\nu(\text{Pd}-\text{Cl})$ ; 517  $\nu(\text{Pd}-\text{S})$ ; 546  $\nu(\text{Pd}-\text{N})$ ; 1103  $\nu(\text{P}-\text{Ph}_3)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 261 (68100), 372 (17400), 533 (2500).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,58 (dd,  $J = 12,0, 7,6$  Hz, 6H), 7,41 (q,  $J = 7,9$  Hz, 9H), 5,59 – 5,53 (m, 1H), 4,65 (s, 1H), 3,36 (p,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,11 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  30,06, 18,57, 7,07.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,60, 164,31, 157,74, 146,70, 136,41, 134,34, 134,22, 131,48, 131,00, 128,41, 128,30, 114,75, 41,28, 14,75, 13,76.



$[\text{PtCl}(\text{TET})\text{PPh}_3]$  (PtT): Cor: laranja, rendimento de 57,64%. P.F: 203-207°. Condutividade molar ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 46,41  $\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . Anal. Cal. (%) para

$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{ClN}_3\text{PPtS}_{2,0,5}\text{H}_2\text{O}$ : C 45,03; H 3,92; N 5,83, encontrado C 45,03; H 3,92; N 5,83. IR (ICS, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1605  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 757  $\nu(\text{C}=\text{S})$ ; 3203  $\nu(\text{N}-\text{H})$ ; 998  $\nu(\text{N}-\text{N})$ ; 1319  $\nu(\text{C}-\text{N})$ ; 344  $\nu(\text{Pd}-\text{Cl})$ ; 516  $\nu(\text{Pd}-\text{S})$ ; 545  $\nu(\text{Pd}-\text{N})$ ; 1089  $\nu(\text{P}-\text{Ph}_3)$ . UV-VIS ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , DMSO): 259 (67900), 368 (17200), 529 (2000).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,87 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 7,57 (dd,  $J = 12,2, 7,8$  Hz, 6H), 7,46 (dt,  $J = 14,1, 7,0$  Hz, 9H), 7,00 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H), 5,75 (s, 1H),

3,41 (p,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 2,68 (s, 3H), 1,23 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  29,50, 17,24, 4,98.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177,07, 163,45, 154,88, 144,34, 134,31, 134,19, 131,59, 130,42, 130,08, 129,46, 128,74, 128,63, 40,53, 15,68, 14,04.

## 7.2 – Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

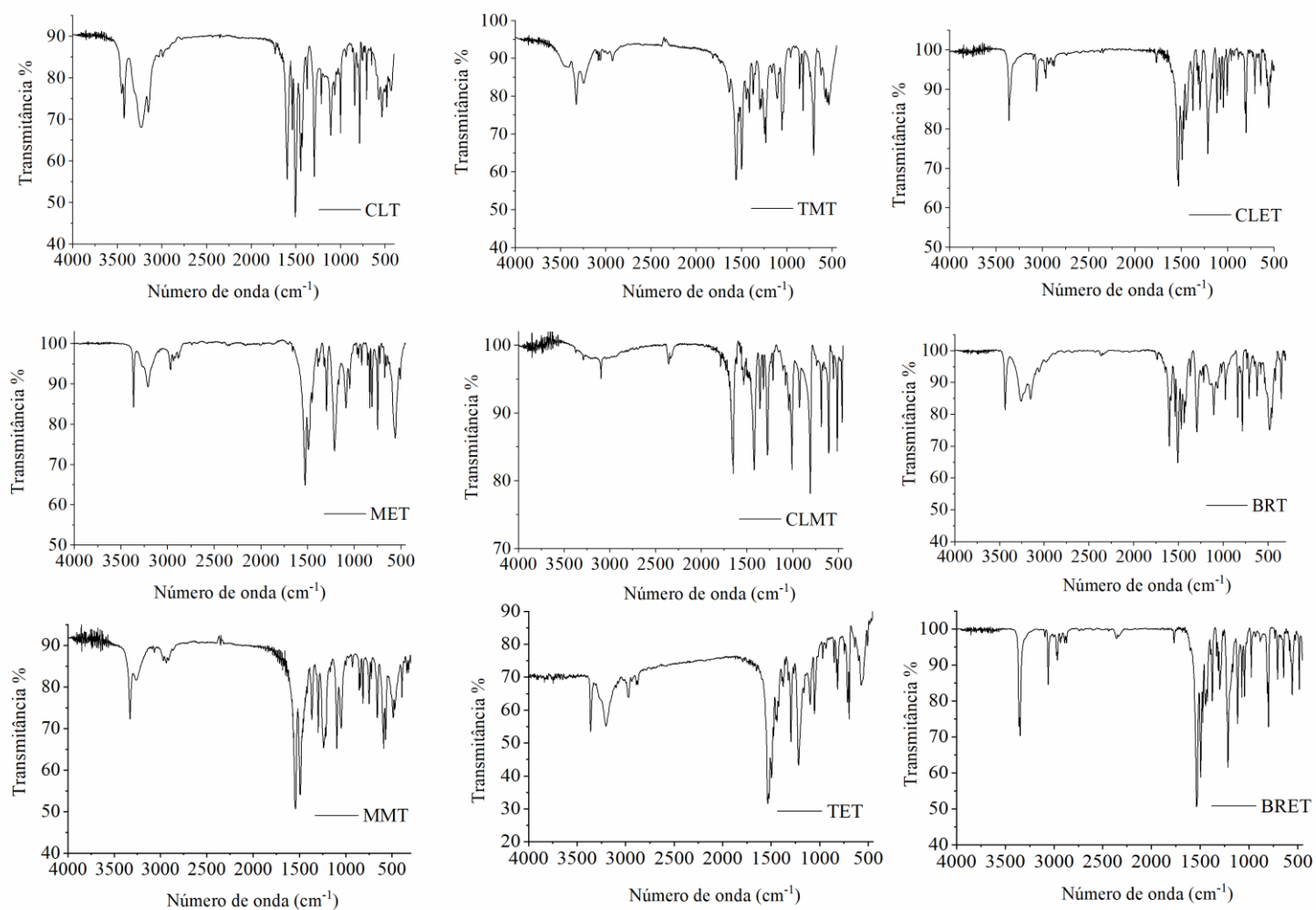


FIGURA A1 – Espectros de IV dos ligantes obtidos.

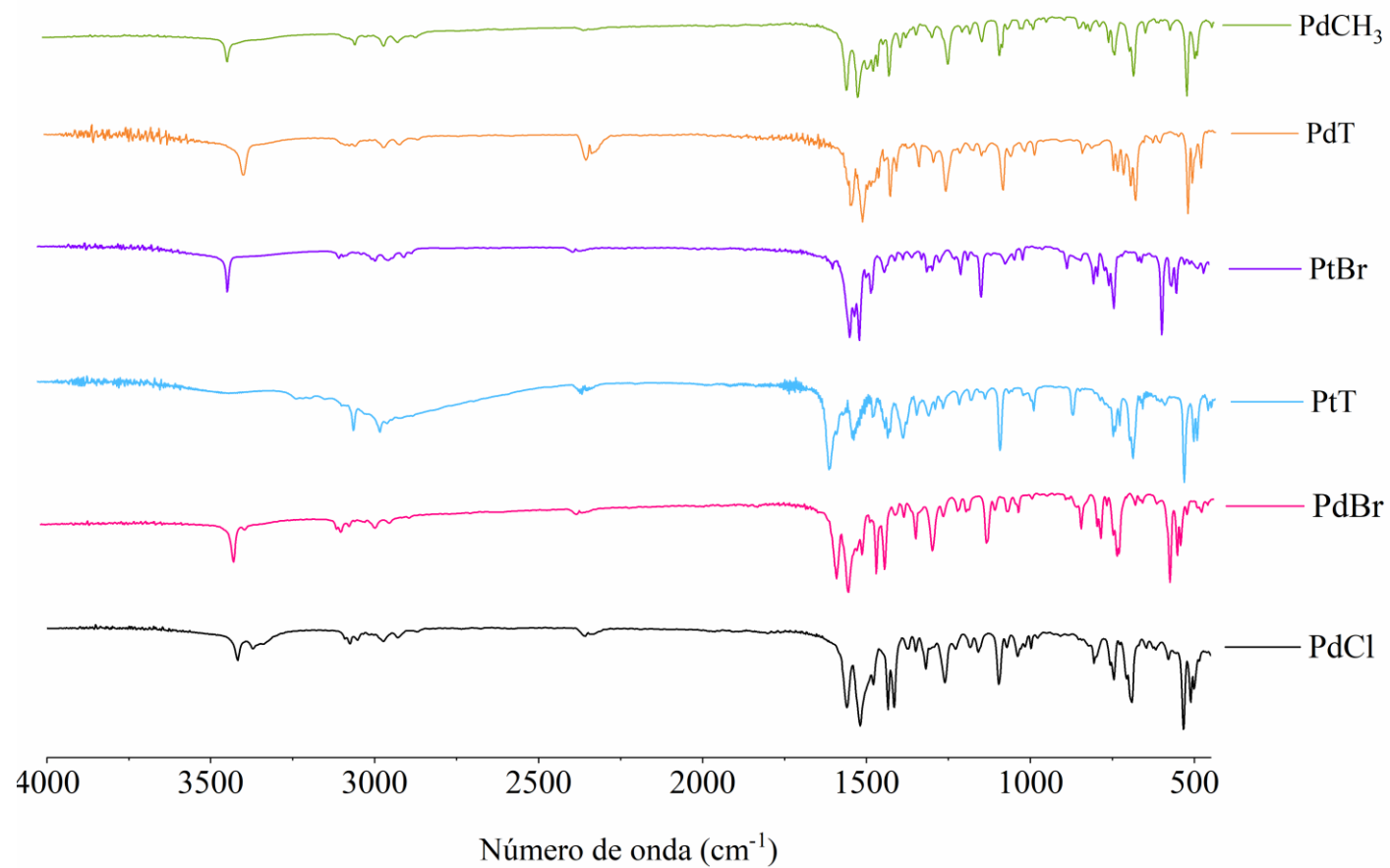


FIGURA A2 – Espectros de IV dos complexos de Pd(II) e Pt(II).

**TABELA A1** - Atribuição das bandas de Infravermelho para os compostos.

<b>Compostos</b>	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=S)	N-H	N-N	C-N	M-Cl	M-S	M-N	PPh <sub>3</sub>
CLET	1536 (F)	812 (F)	3106 (f)	1085 (m)	1309 (m)	-	-	-	-
BRET	1536 (F)	808 (m)	3105 (f)	1083 (m)	1307 (m)	-	-	-	-
TET	1539 (F)	815 (F)	3203 (m)	1100 (m)	1294 (m)	-	-	-	-
MET	1526 (F)	810 (F)	3209 (m)	1086 (m)	1297 (m)	-	-	-	-
CLT	1597 (F)	784 (F)	3233 (m)	1110 (m)	1296 (F)	-	-	-	-
CLMT	1653 (F)	804 (F)	3097 (f)	1014 (F)	1287 (F)	-	-	-	-
BRT	1602 (F)	785 (F)	3152 (m)	1104 (m)	1295 (F)	-	-	-	-
TMT	1558 (F)	817 (m)	3241 (f)	1058 (F)	1302 (m)	-	-	-	-
MMT	1544 (F)	815 (f)	3259 (m)	1099 (m)	1296 (m)	-	-	-	-
PdBr	1554 (F)	746 (m)	-	1071 (f)	1318 (m)	344 (f)	510 (m)	534 (F)	1098 (F)
PdCl	1562 (F)	745 (m)	-	1073 (f)	1322(m)	339 (f)	513 (m)	534 (F)	1097 (F)
PdT	1557 (F)	764 (m)	-	1076 (f)	1311 (f)	338 (f)	522 (m)	536 (F)	1096 (F)
PdCH <sub>3</sub>	1570 (F)	750 (m)	-	1076 (f)	1307 (f)	334 (f)	509 (m)	532 (F)	1102 (F)
PtBr	1505 (F)	758 (m)	-	1028 (f)	1394 (f)	340 (f)	517 (m)	546 (F)	1103 (F)
PtT	1605 (F)	757 (F)	3203 (f)	998 (m)	1319 (f)	344 (f)	516 (m)	545 (F)	1089 (F)



### 7.3 – Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)

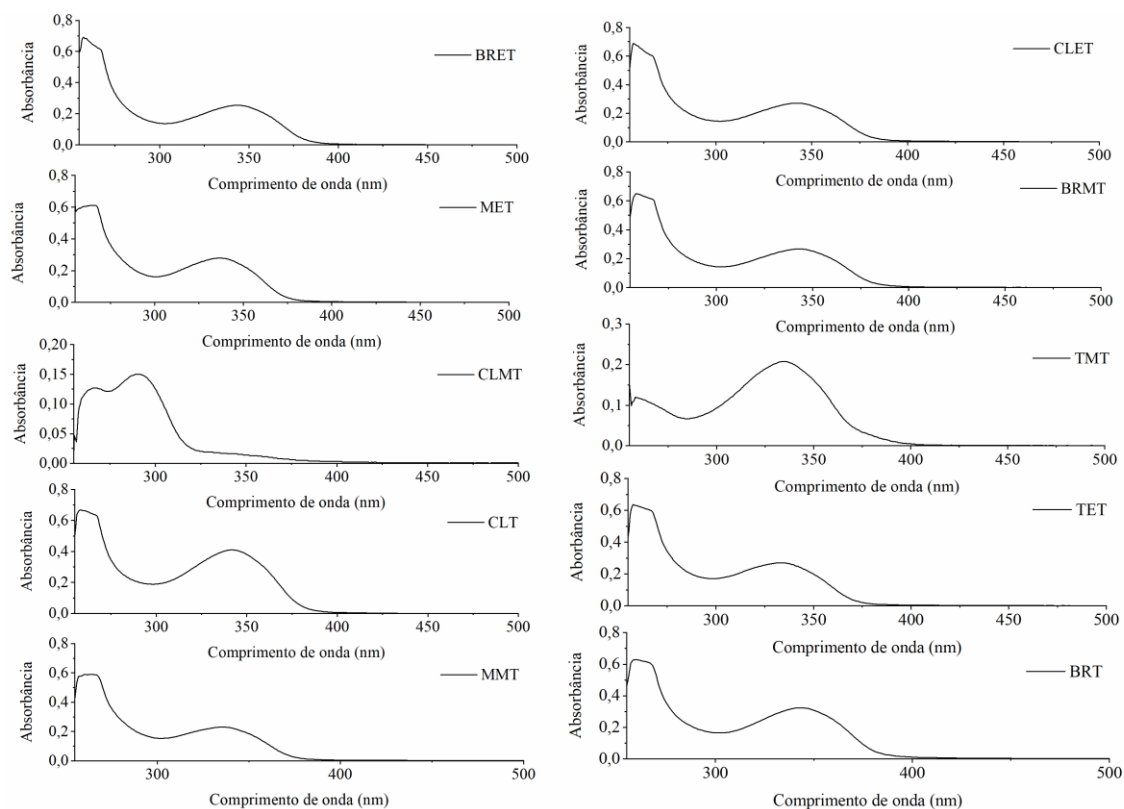


FIGURA A3 – Espectros de UV dos ligantes sintetizados em DMSO na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

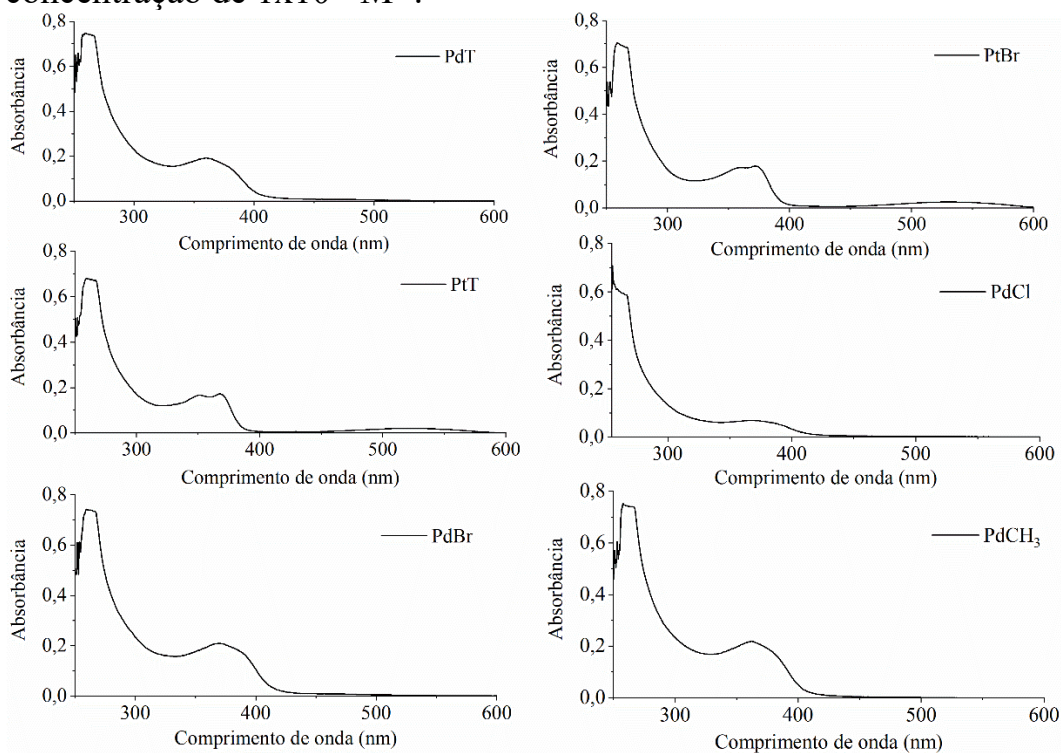


FIGURA A4 – Espectros de UV dos complexos de Pd(II) e Pt(II) em DMSO na concentração de  $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

## 7.4 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

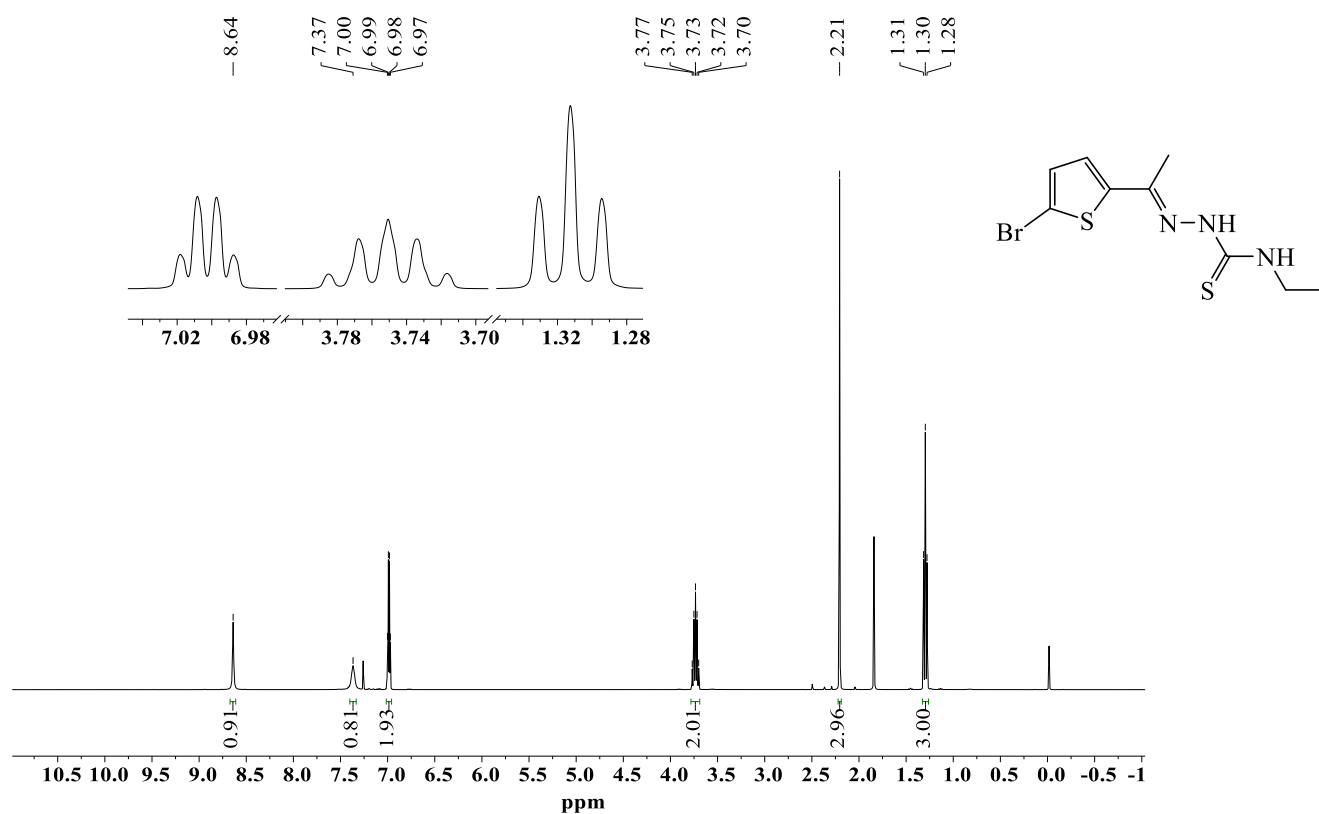


FIGURA A5 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do ligante BRET em CDCl<sub>3</sub>.

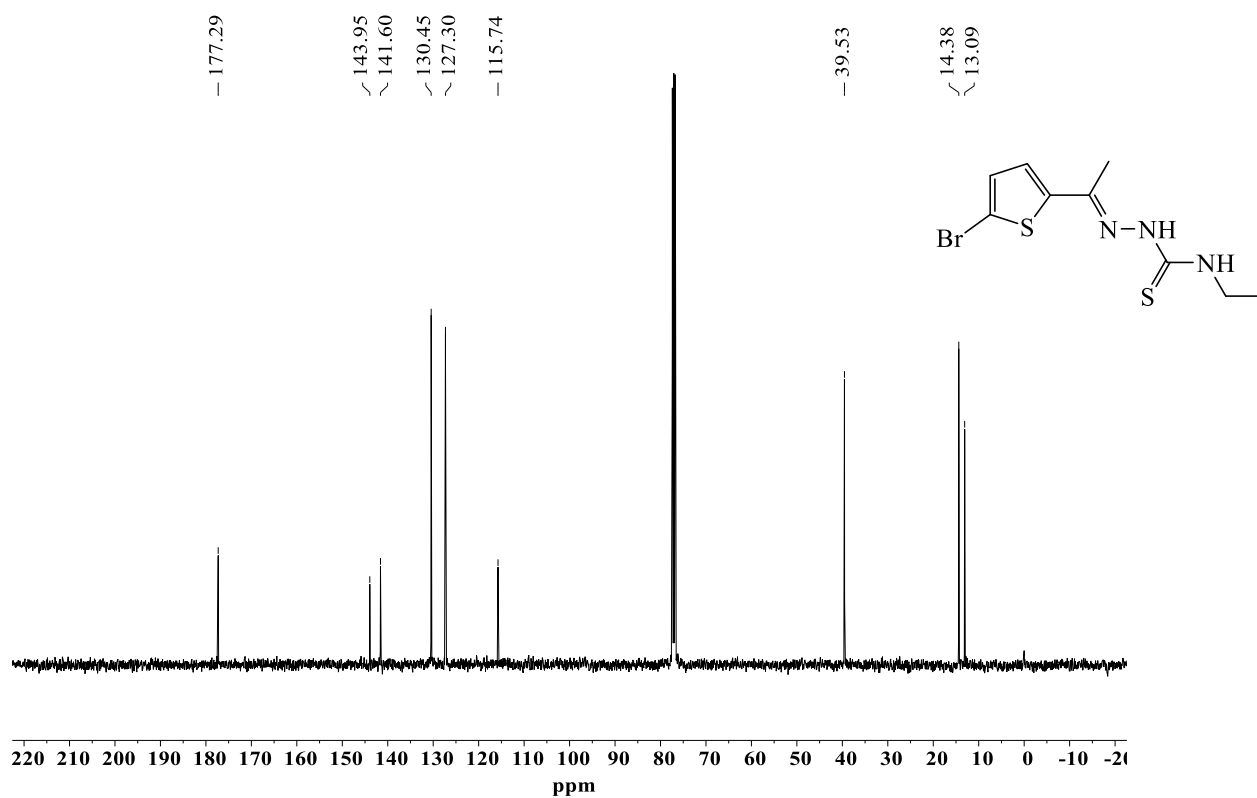


FIGURA A6 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C do ligante BRET em CDCl<sub>3</sub>.

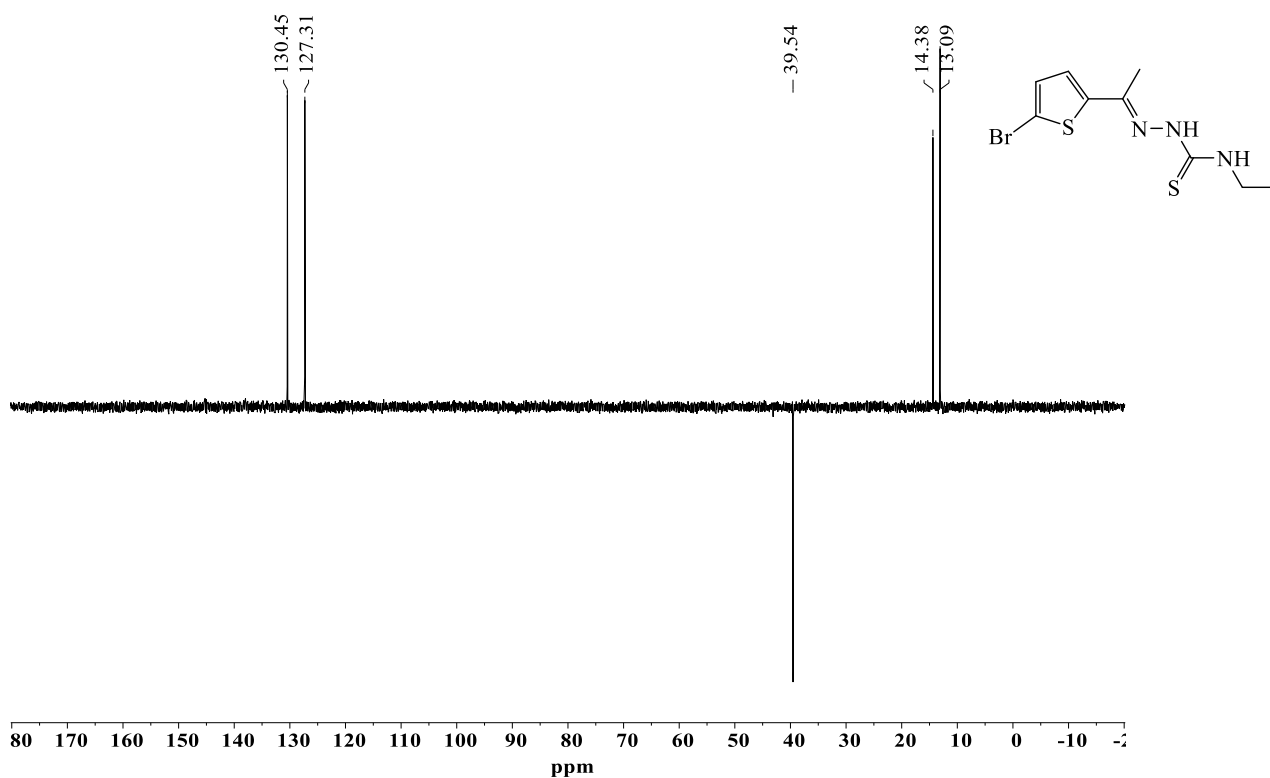


FIGURA A7 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante BRET em  $\text{CDCl}_3$ .

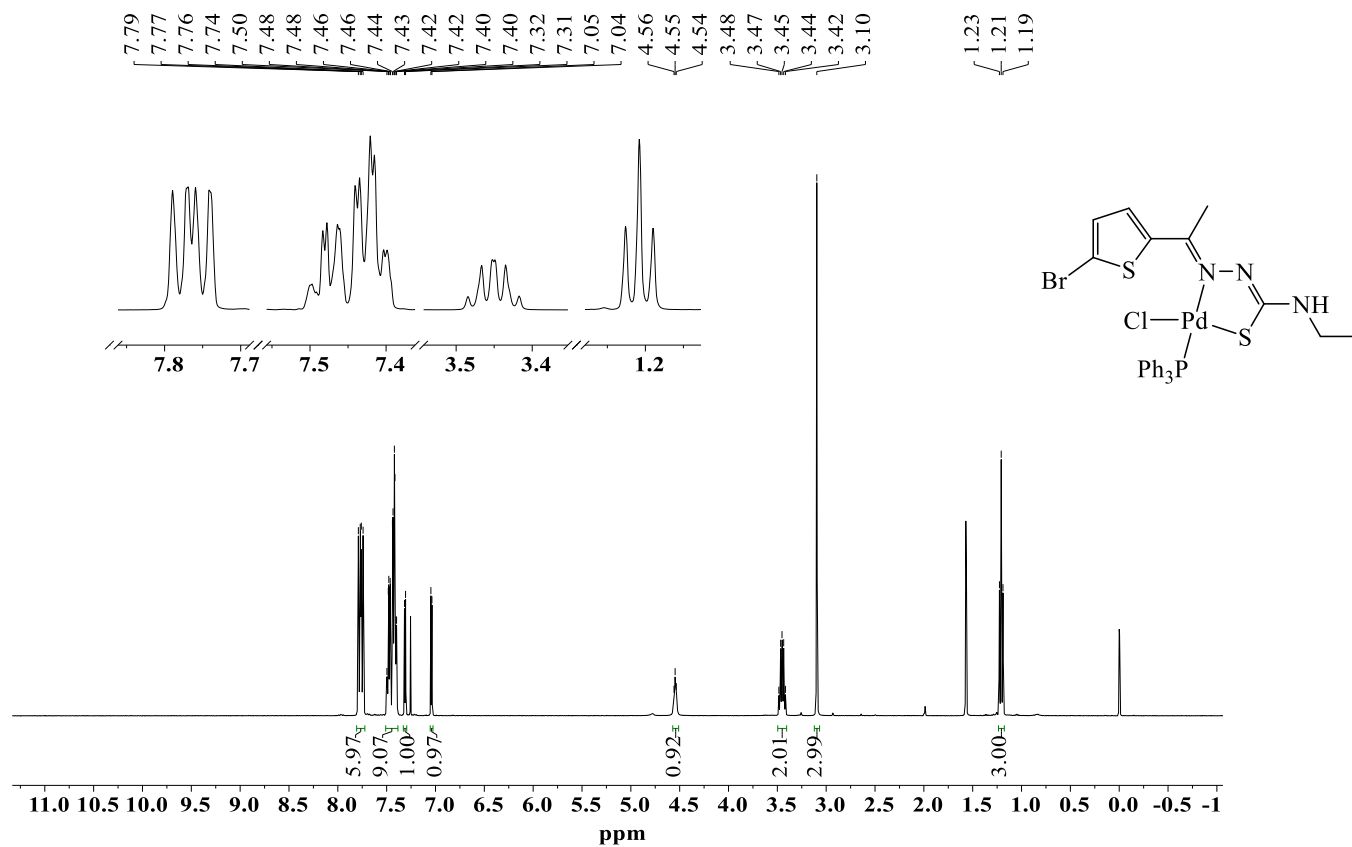


FIGURA A8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo PdBr em  $\text{CDCl}_3$ .

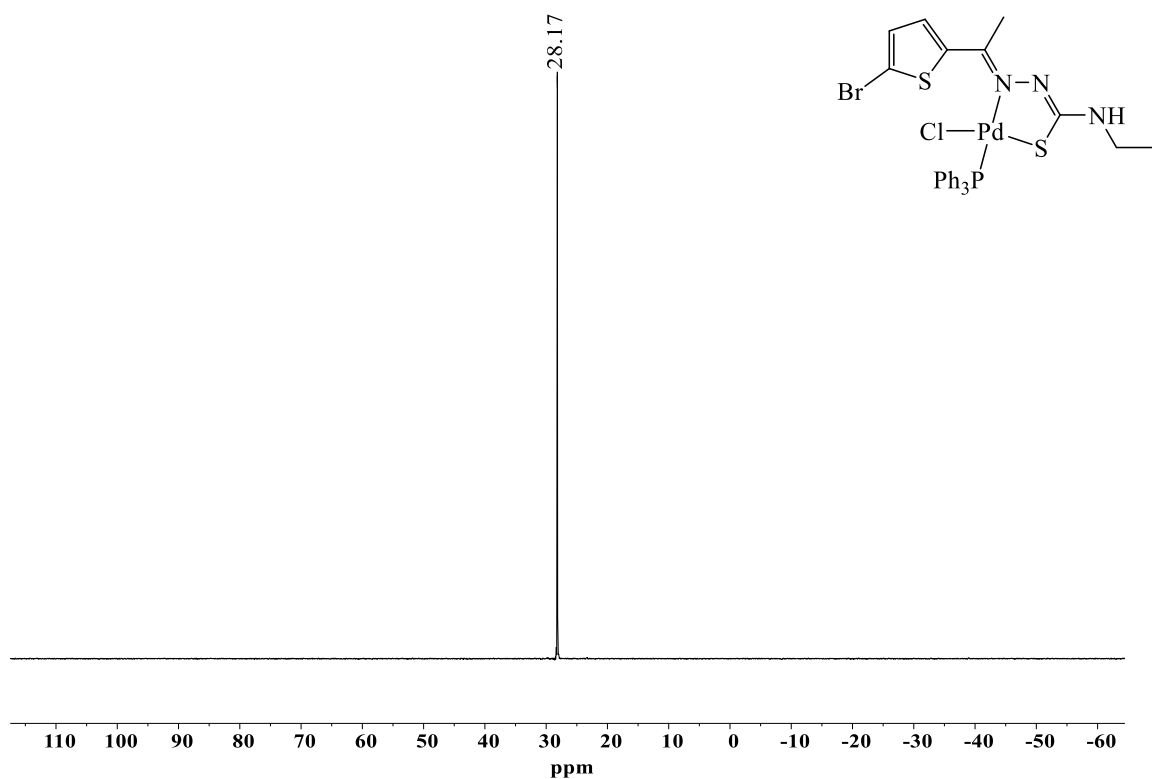


FIGURA A9 - Espectro de RMN <sup>31</sup>P do complexo PdBr em CDCl<sub>3</sub>.

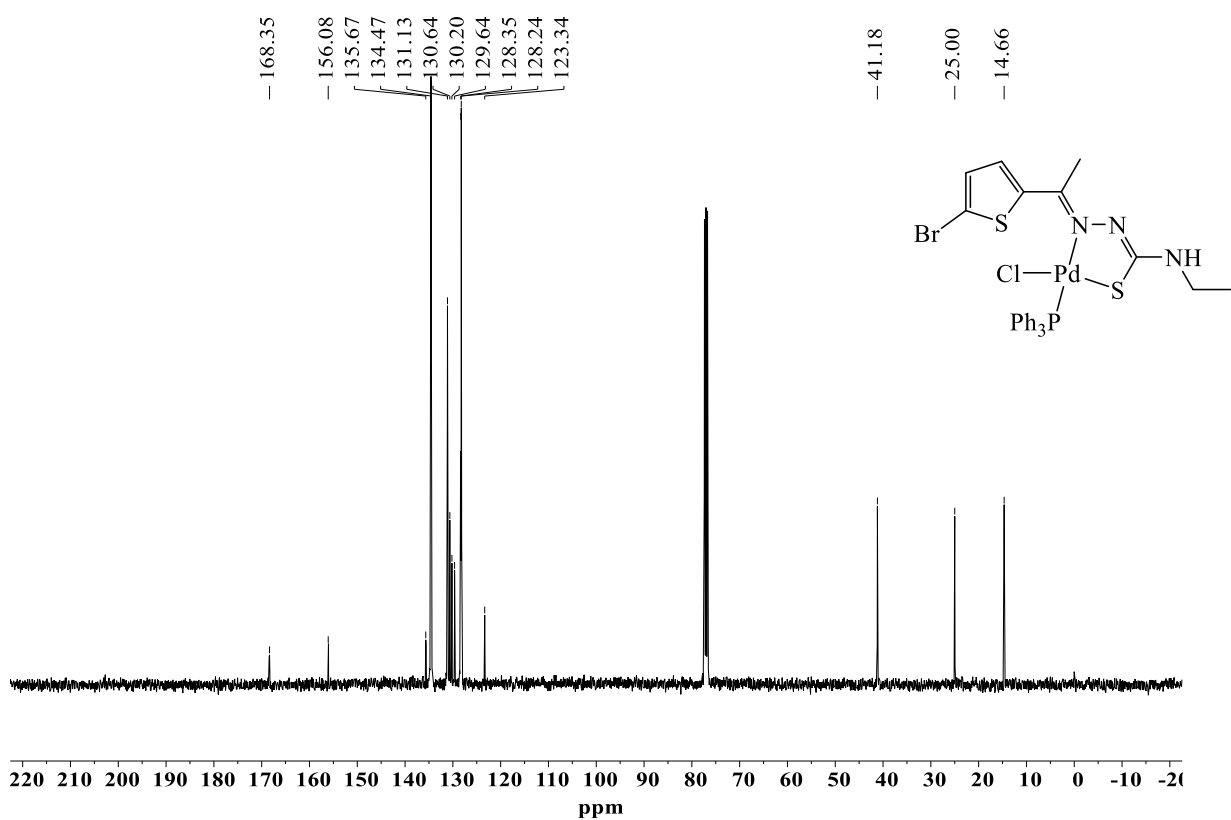


FIGURA A10 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C do complexo PdBr em CDCl<sub>3</sub>.

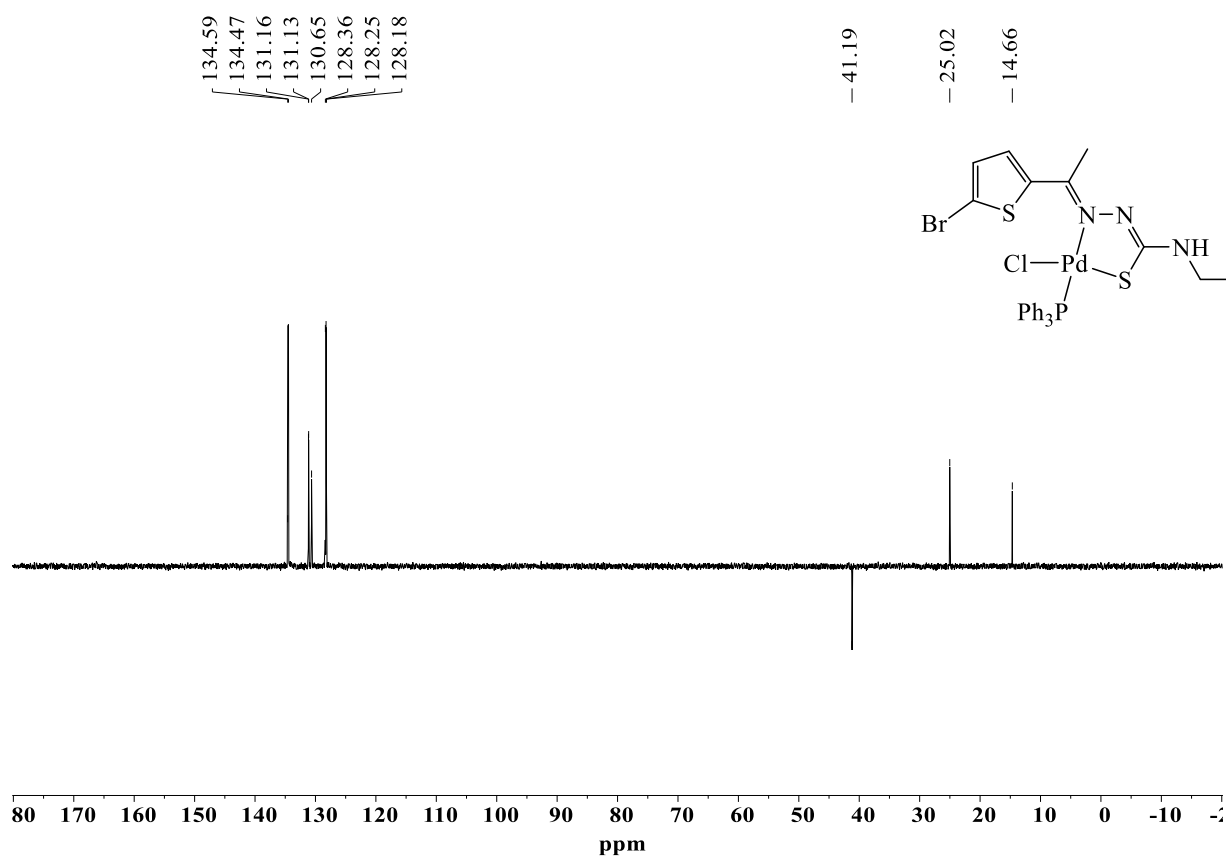


FIGURA A11 - Espectro de RMN DEPT-135 do complexo PdBr em  $\text{CDCl}_3$ .

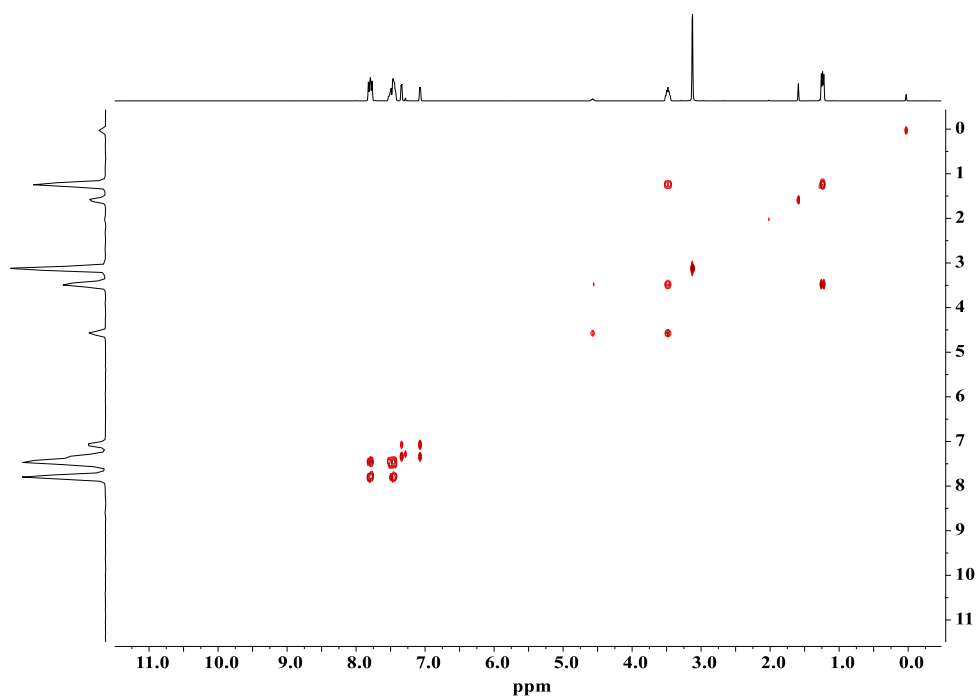


FIGURA A12 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para o complexo PdBr em  $\text{CDCl}_3$ .

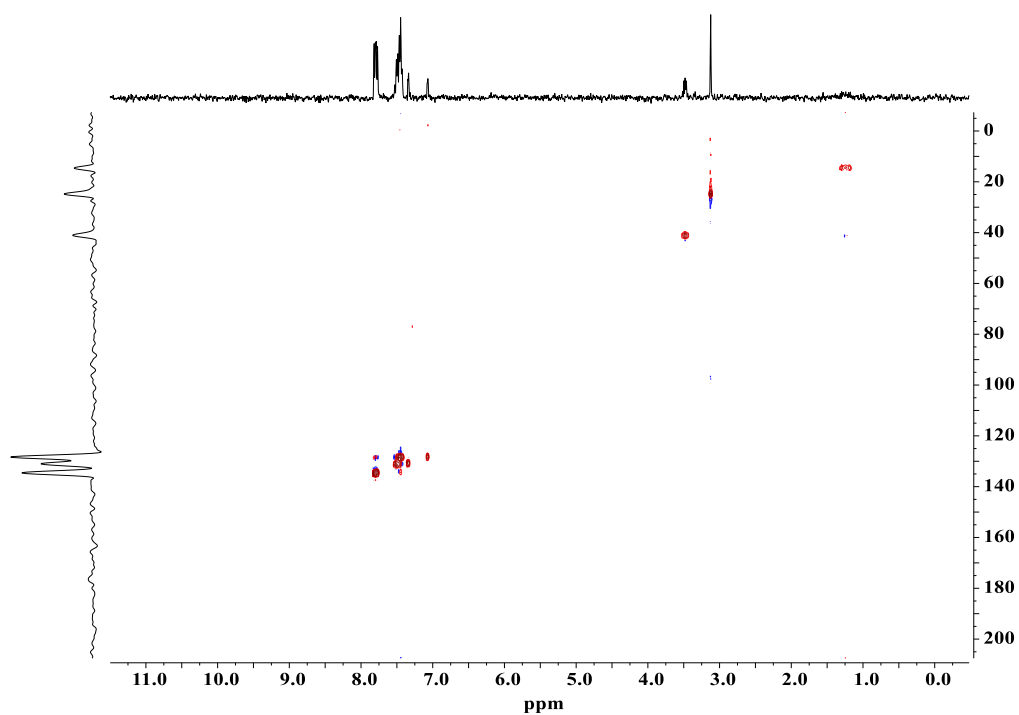


FIGURA A13 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC para o complexo PdBr em  $\text{CDCl}_3$ .

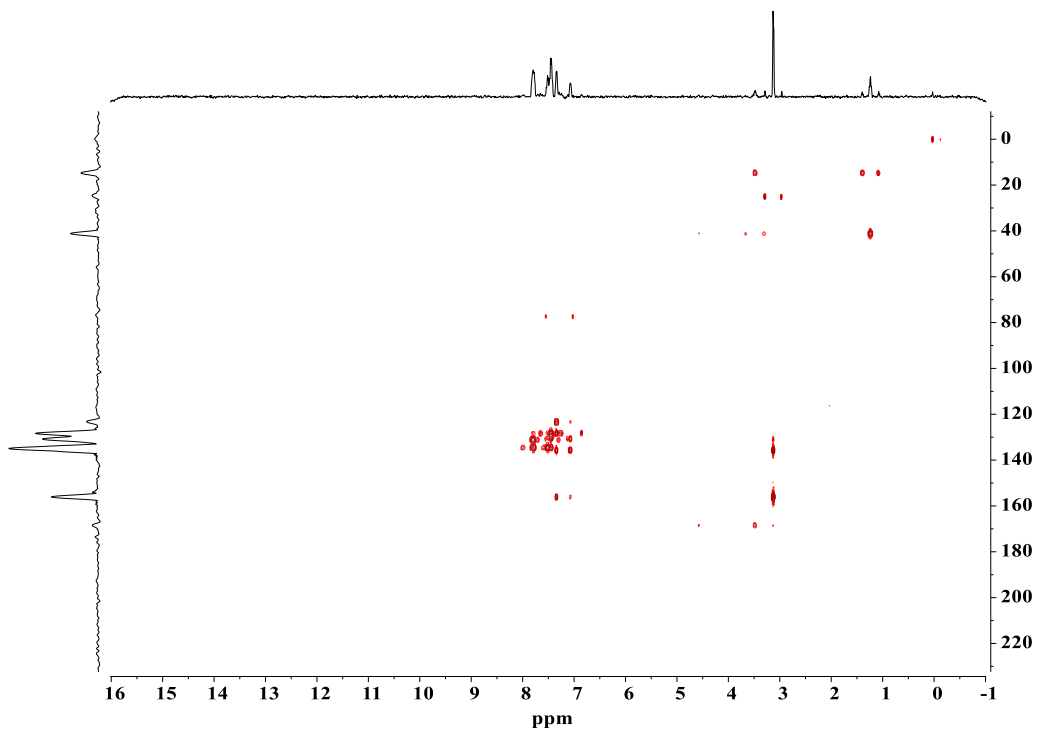


FIGURA A14 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para o complexo PdBr em  $\text{CDCl}_3$ .

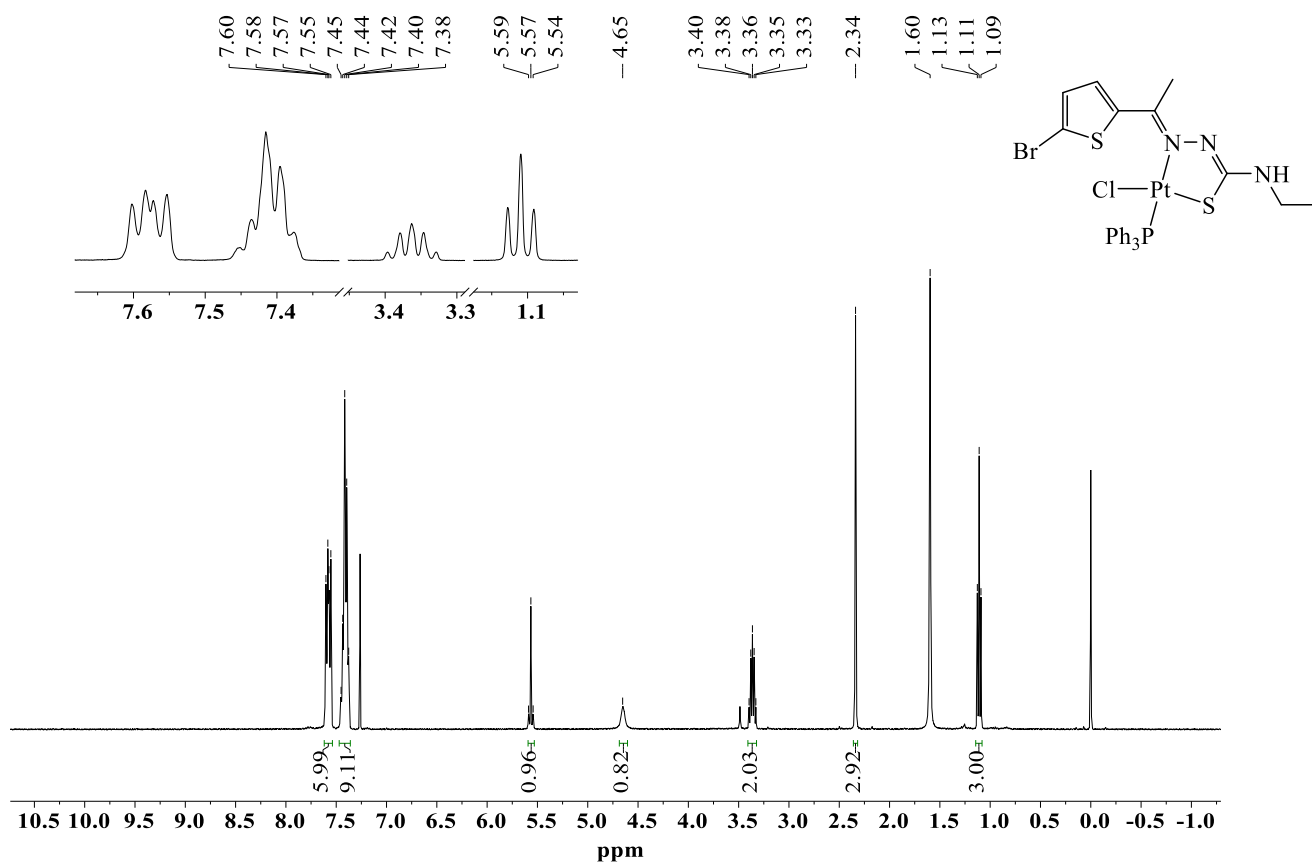


FIGURA A15 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo PtBr em  $\text{CDCl}_3$ .

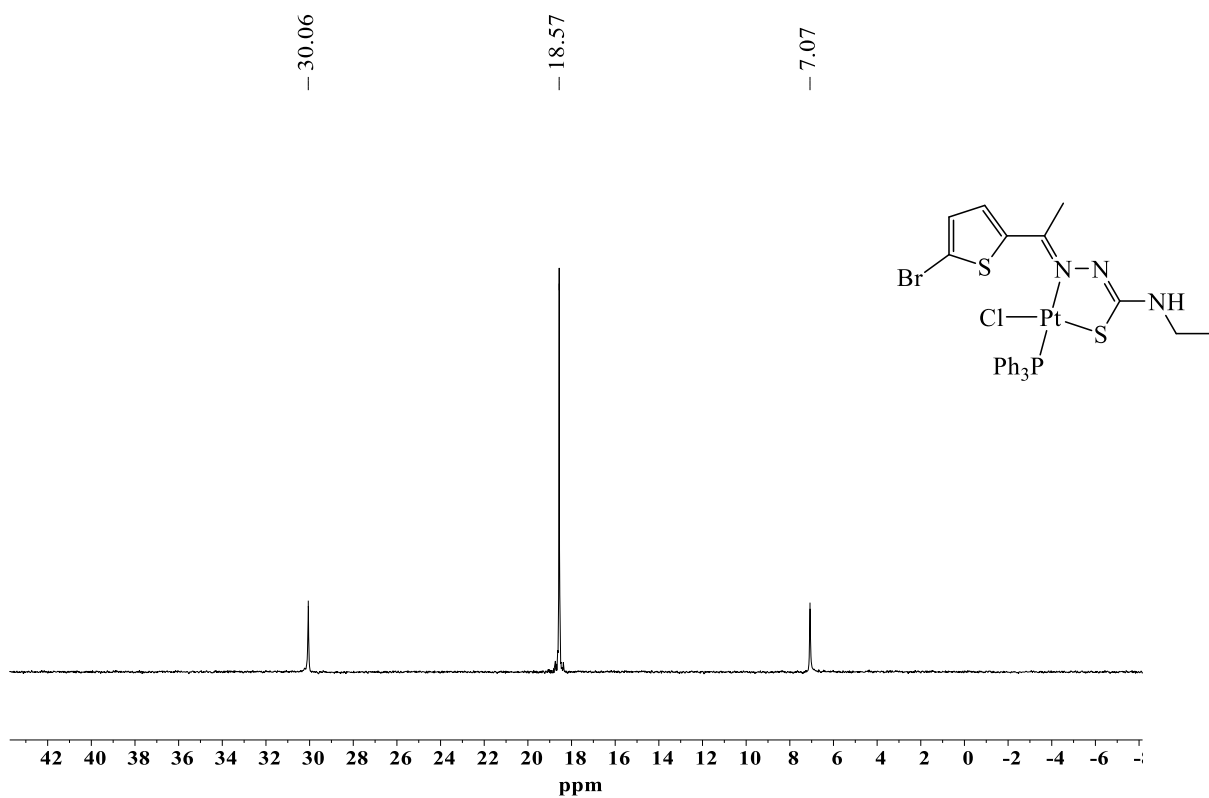


FIGURA A16 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  do complexo PtBr em  $\text{CDCl}_3$ .

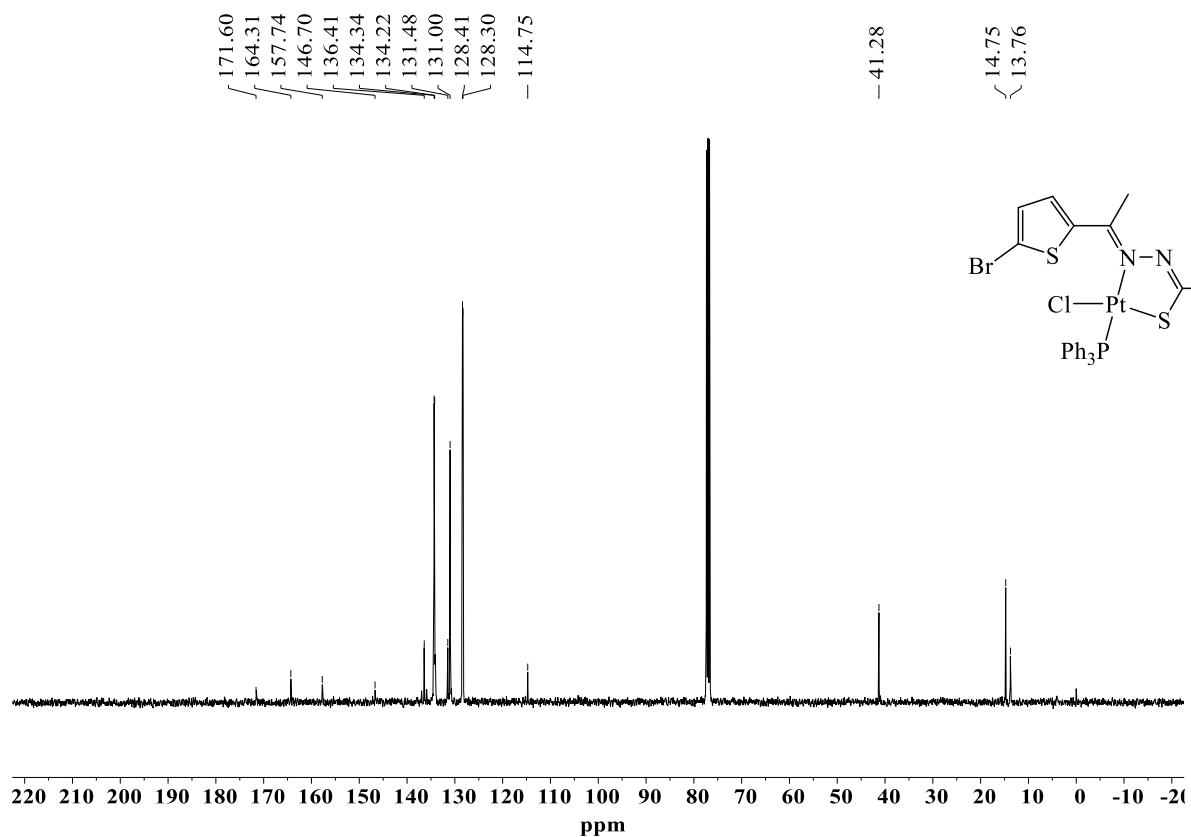


FIGURA A17 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do complexo PtBr em  $\text{CDCl}_3$ .

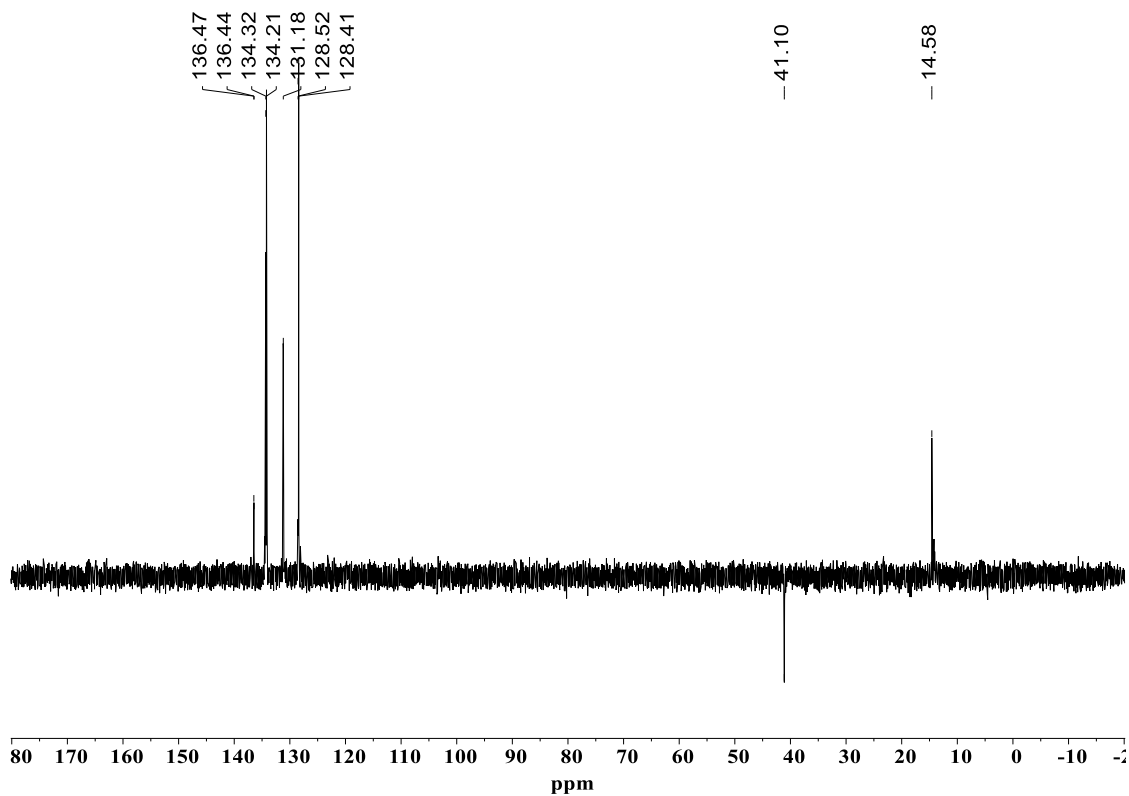


FIGURA A18 - Espectro de RMN DEPT-135 do complexo PtBr em  $\text{CDCl}_3$ .



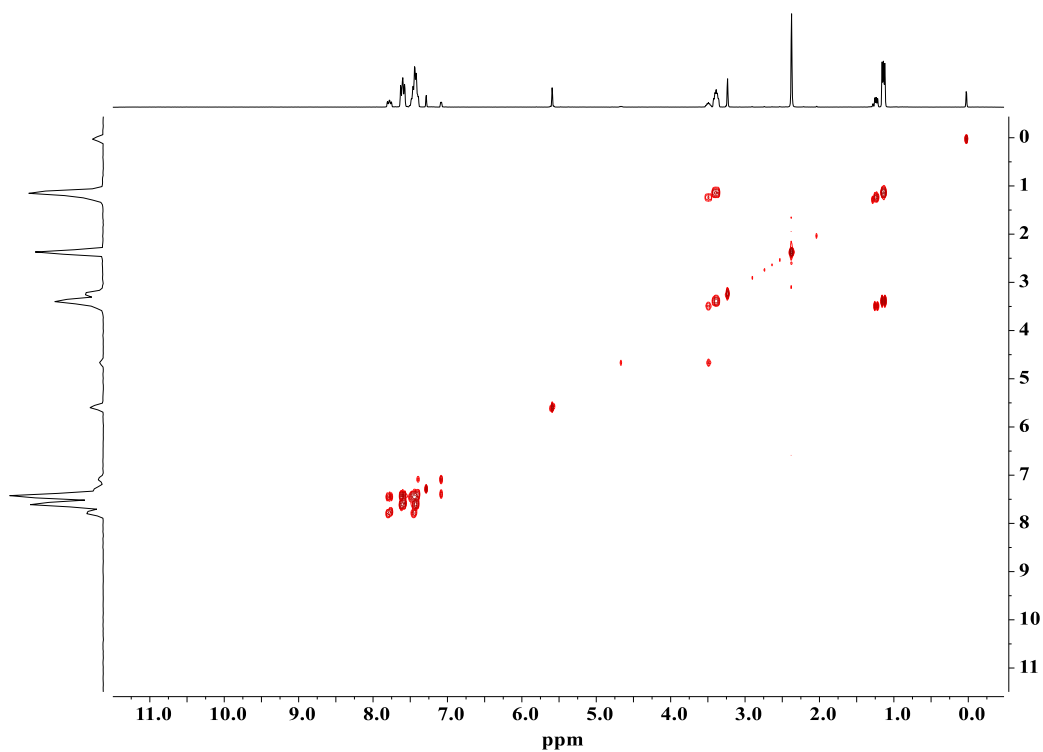


FIGURA A19 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para o complexo PtBr em  $\text{CDCl}_3$ .

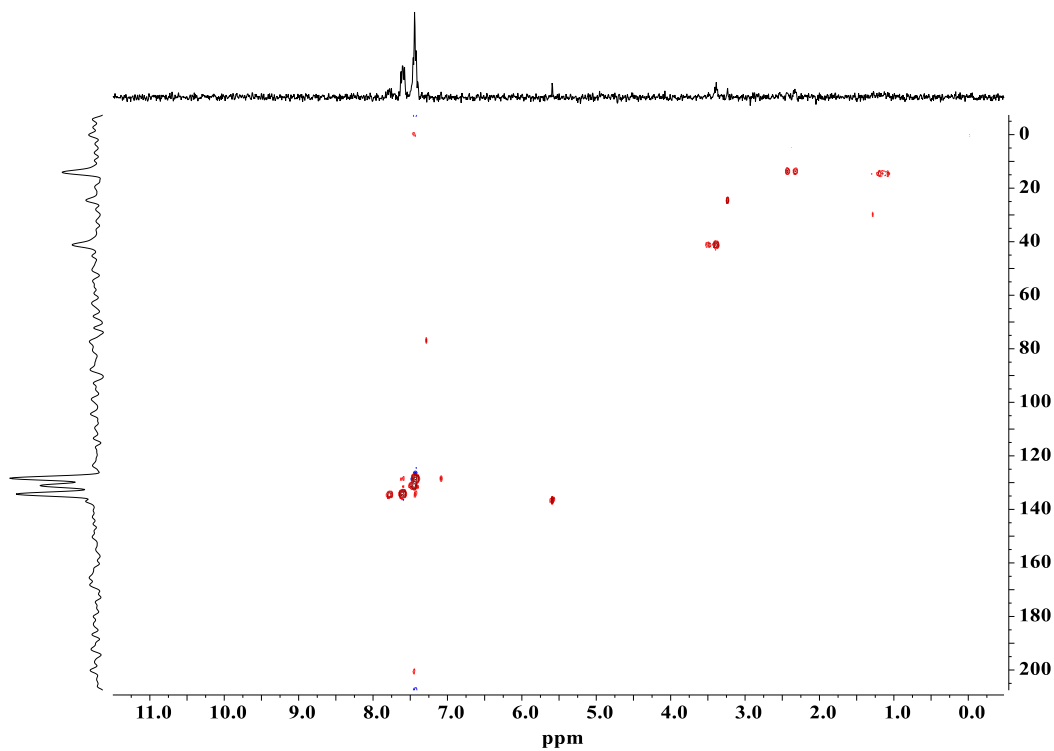


FIGURA A20 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC para o complexo PtBr em  $\text{CDCl}_3$ .

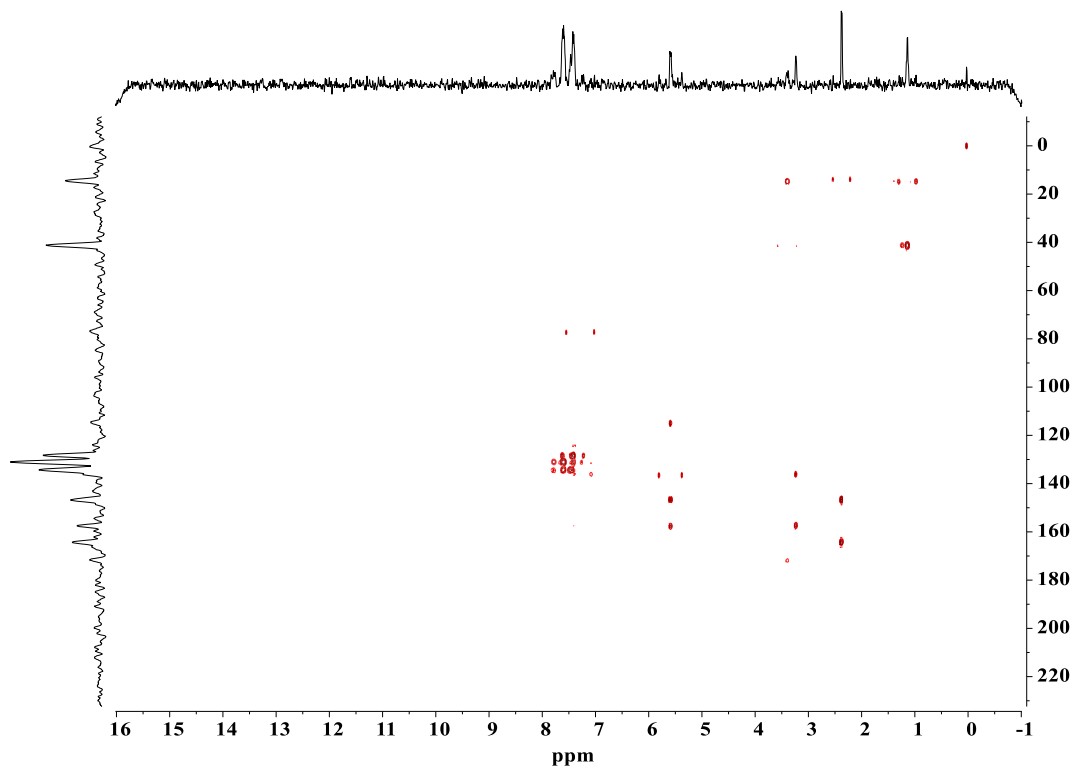


FIGURA A21 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para o complexo PtBr em  $\text{CDCl}_3$ .

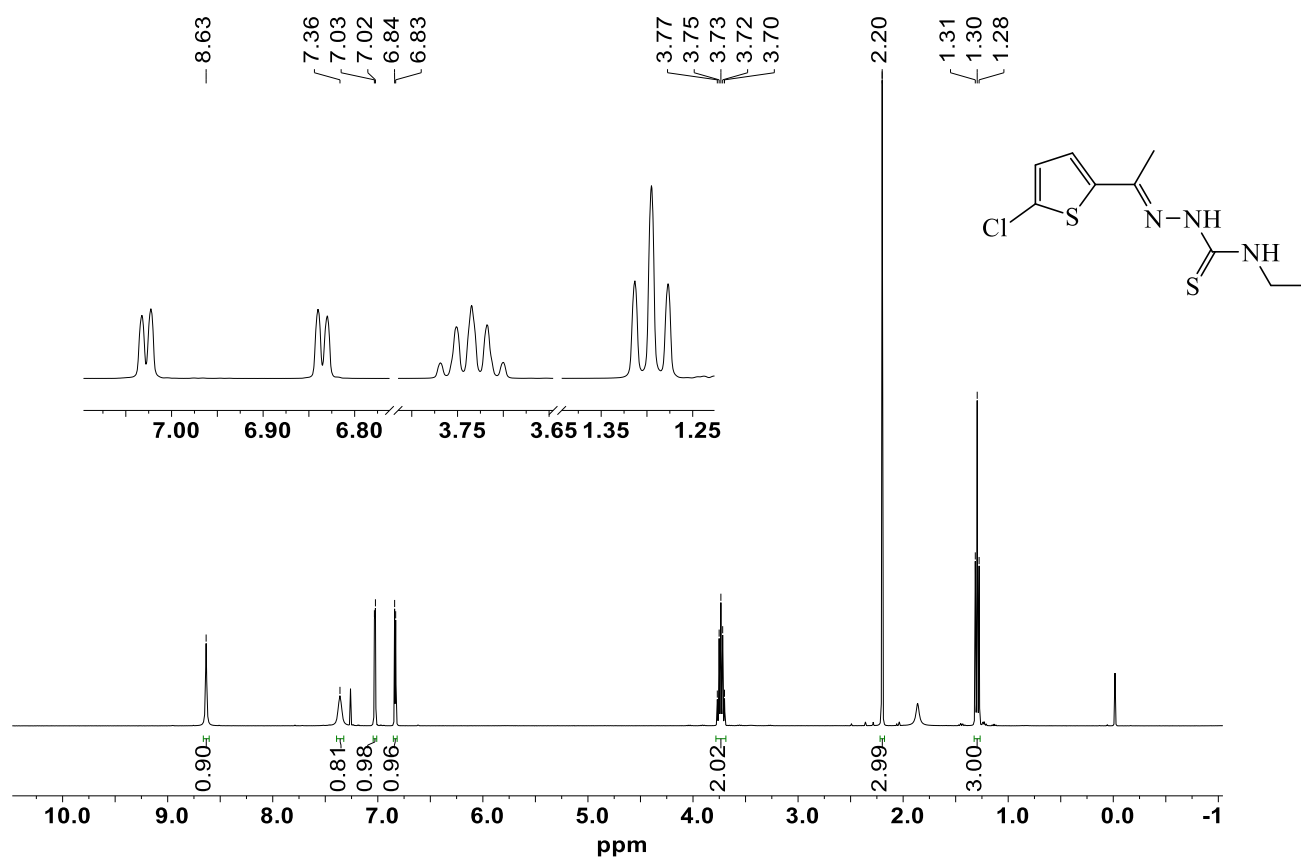


FIGURA A22 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante CLET em  $\text{CDCl}_3$ .

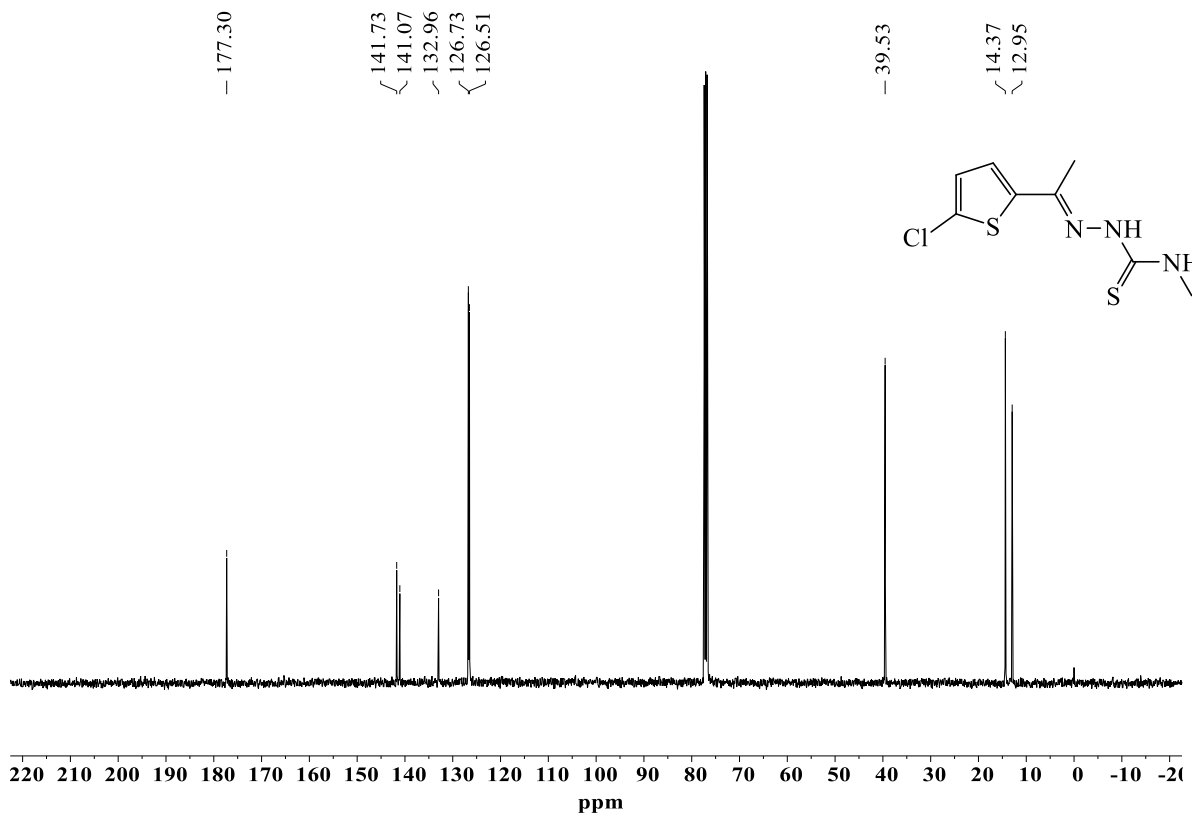


FIGURA A23 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante CLET em  $\text{CDCl}_3$ .

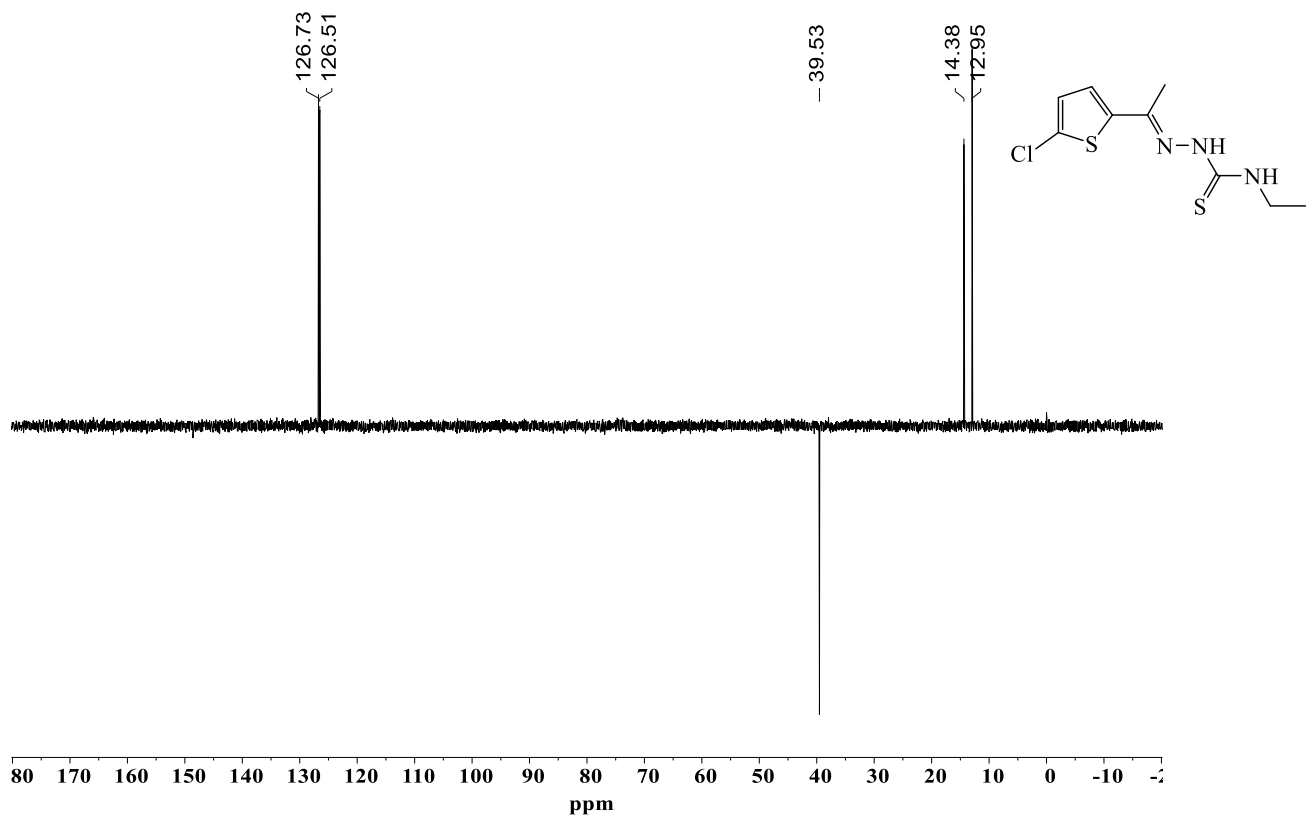


FIGURA A24 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante CLET em  $\text{CDCl}_3$ .

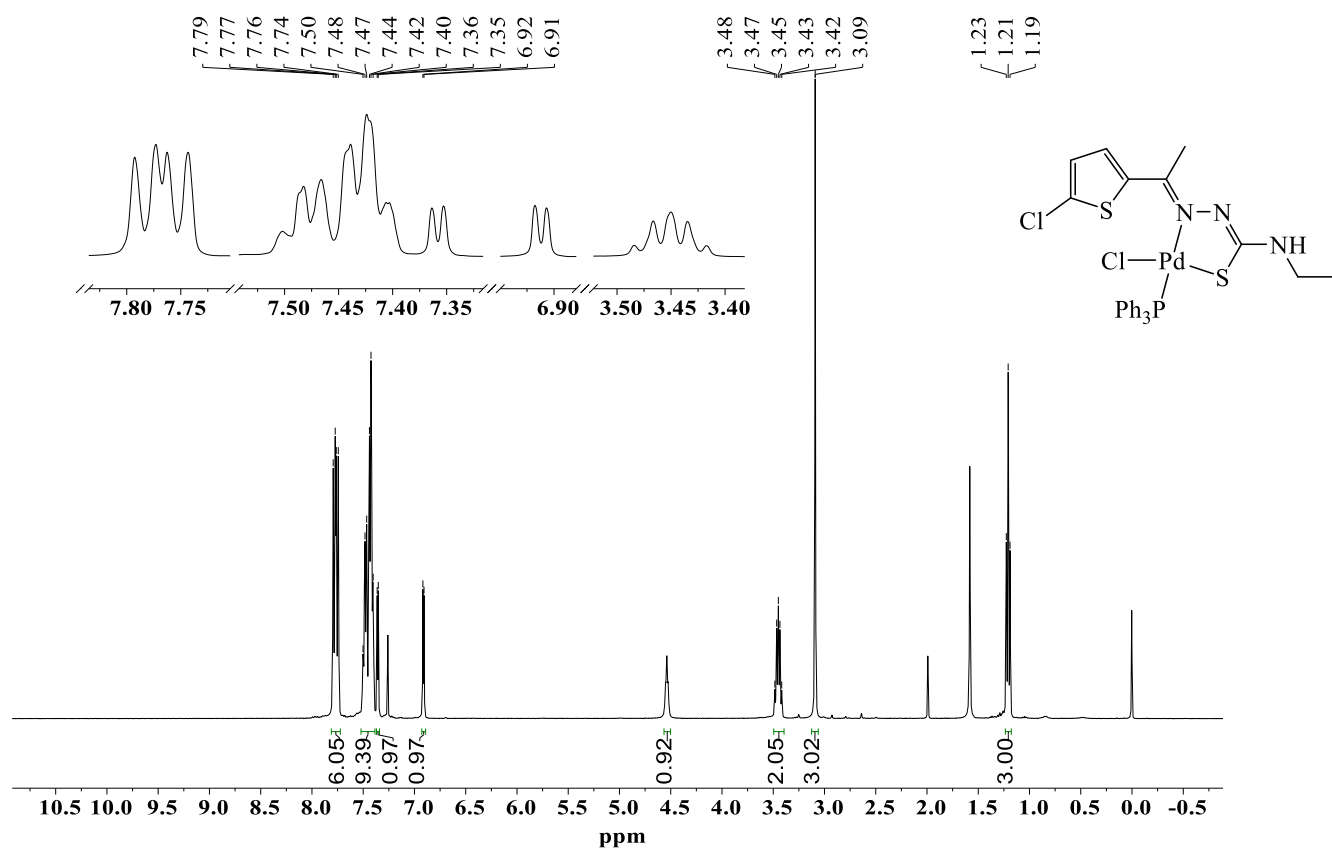


FIGURA A25 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo PdCl em CDCl<sub>3</sub>.

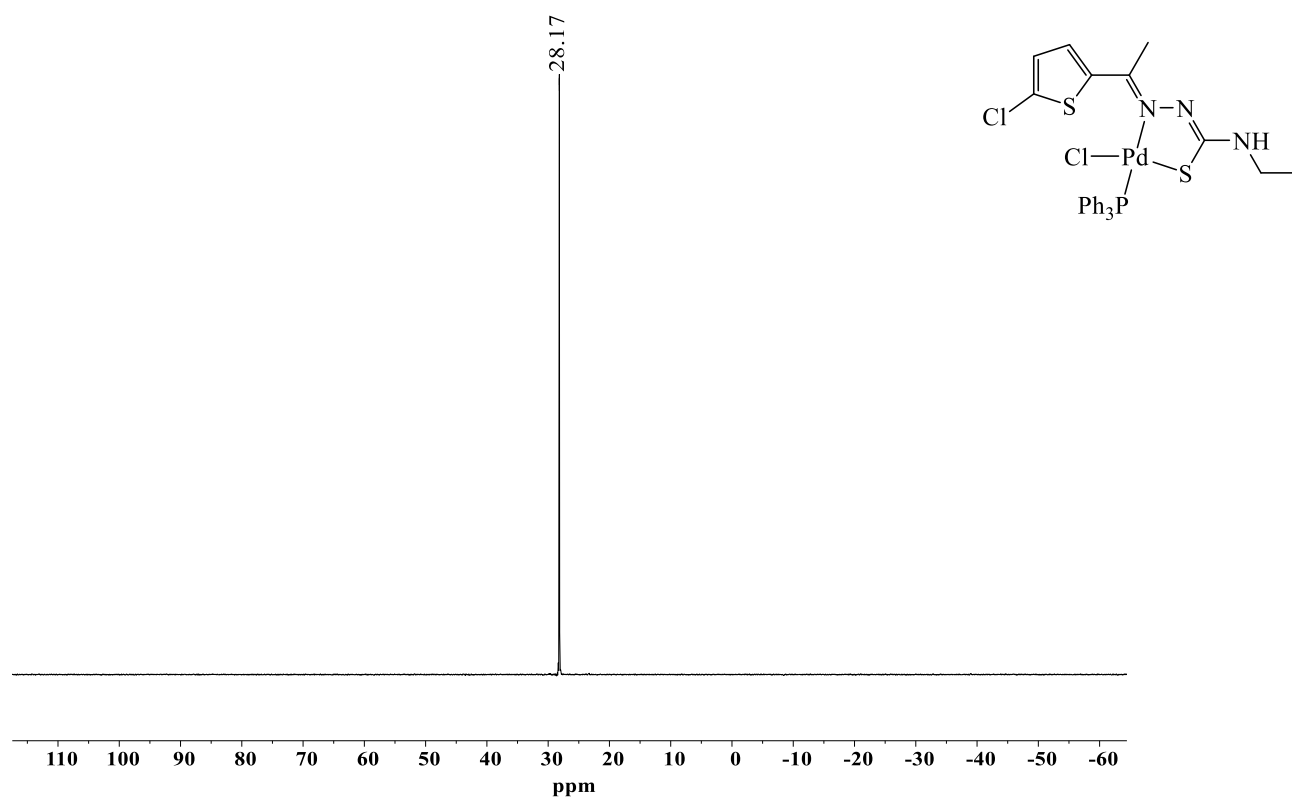


FIGURA A26 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  do complexo PdCl em CDCl<sub>3</sub>.

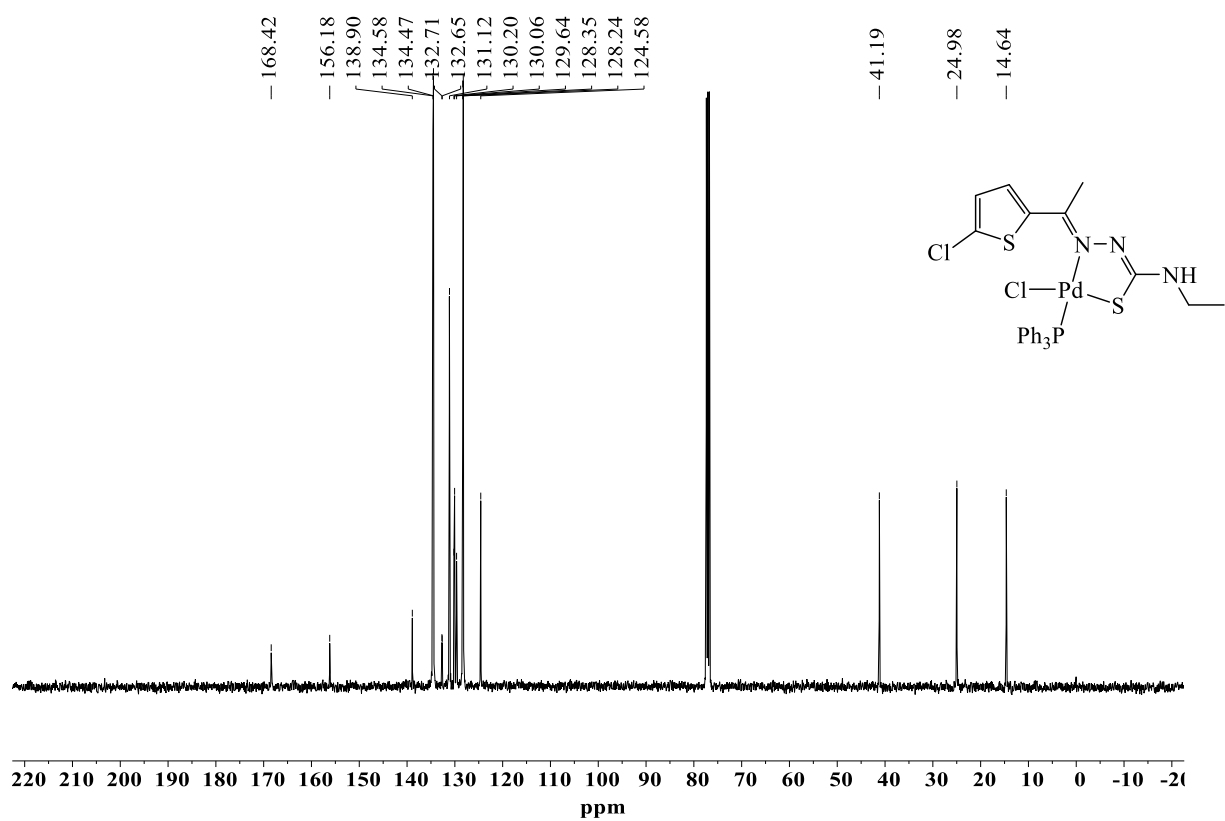


FIGURA A27 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do complexo PdCl em  $\text{CDCl}_3$ .

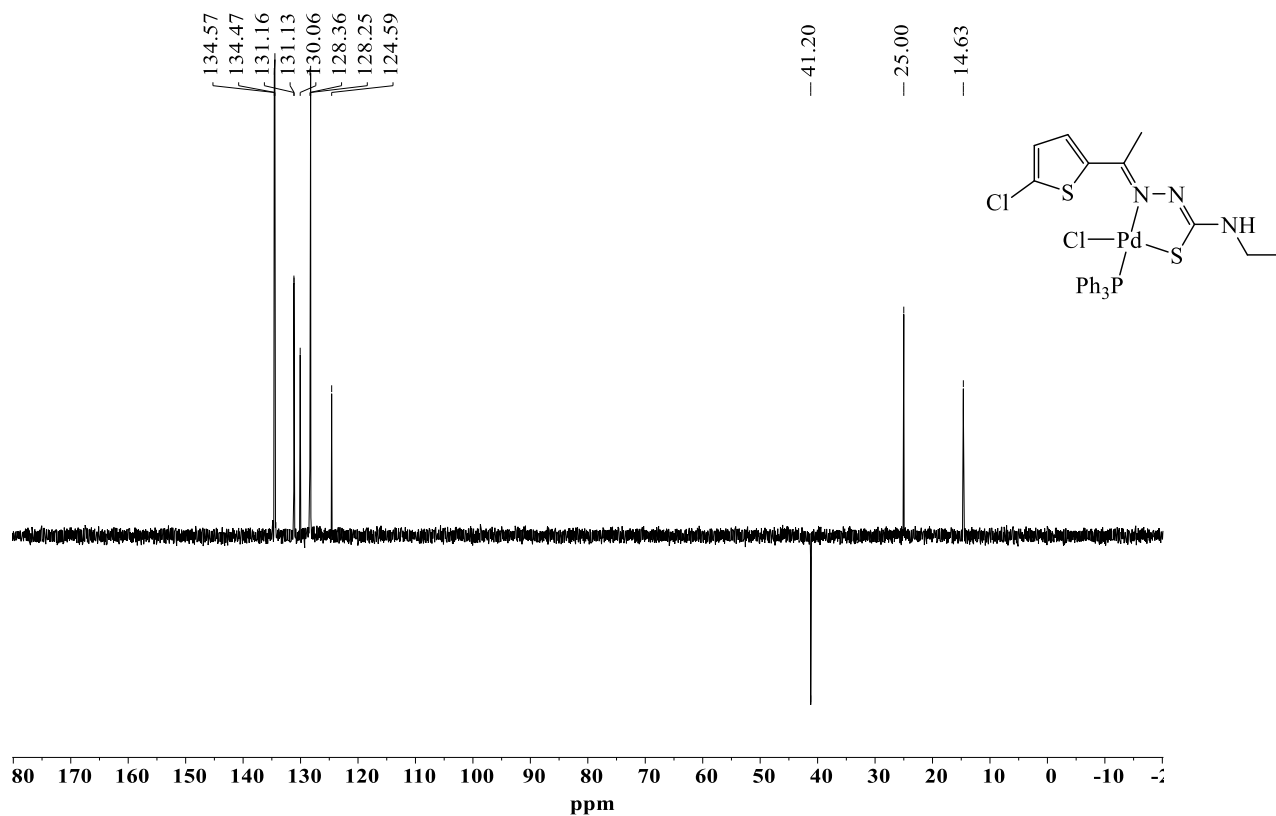


FIGURA A28 - Espectro de RMN DEPT-135 do complexo PdCl em  $\text{CDCl}_3$ .

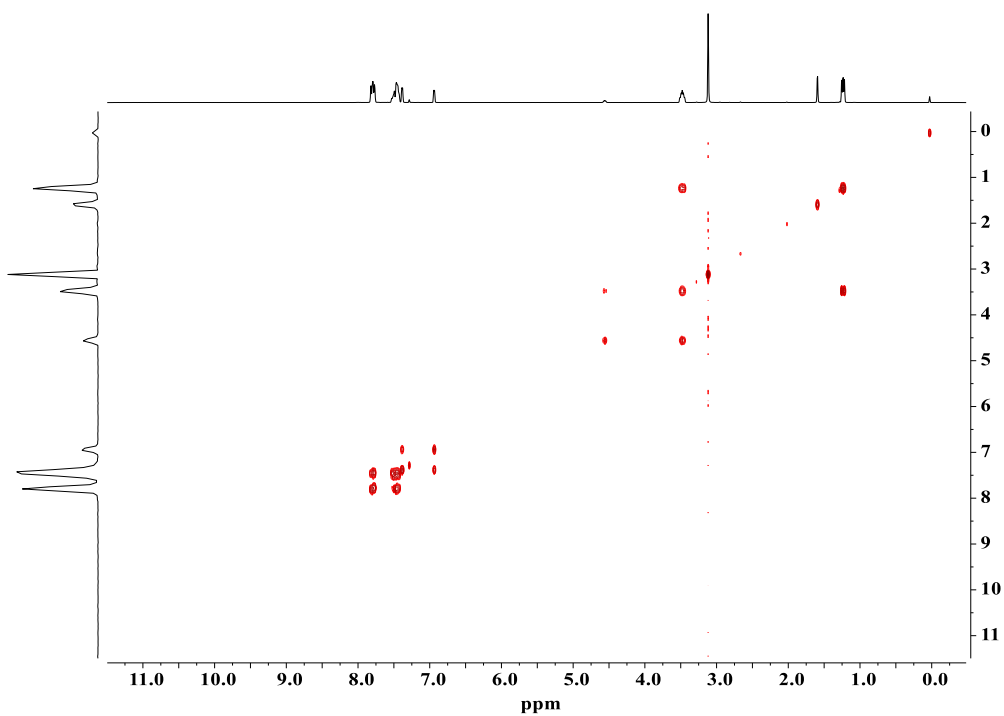


FIGURA A29 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para o complexo PdCl em  $\text{CDCl}_3$ .

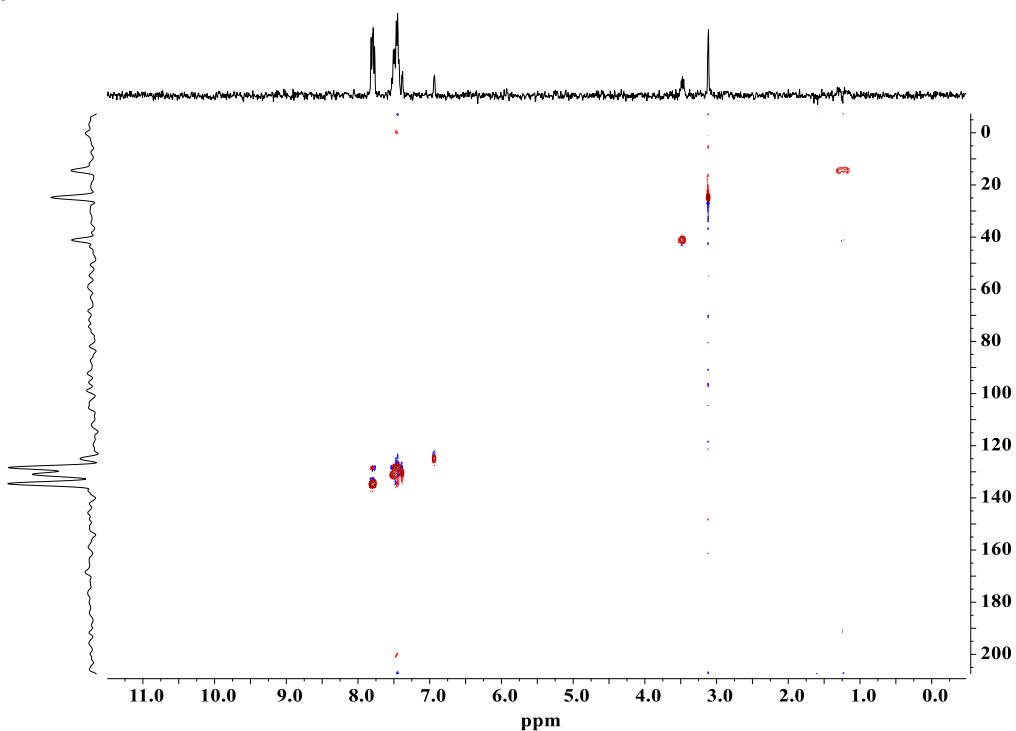


FIGURA A30 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC para o complexo PdCl em  $\text{CDCl}_3$ .

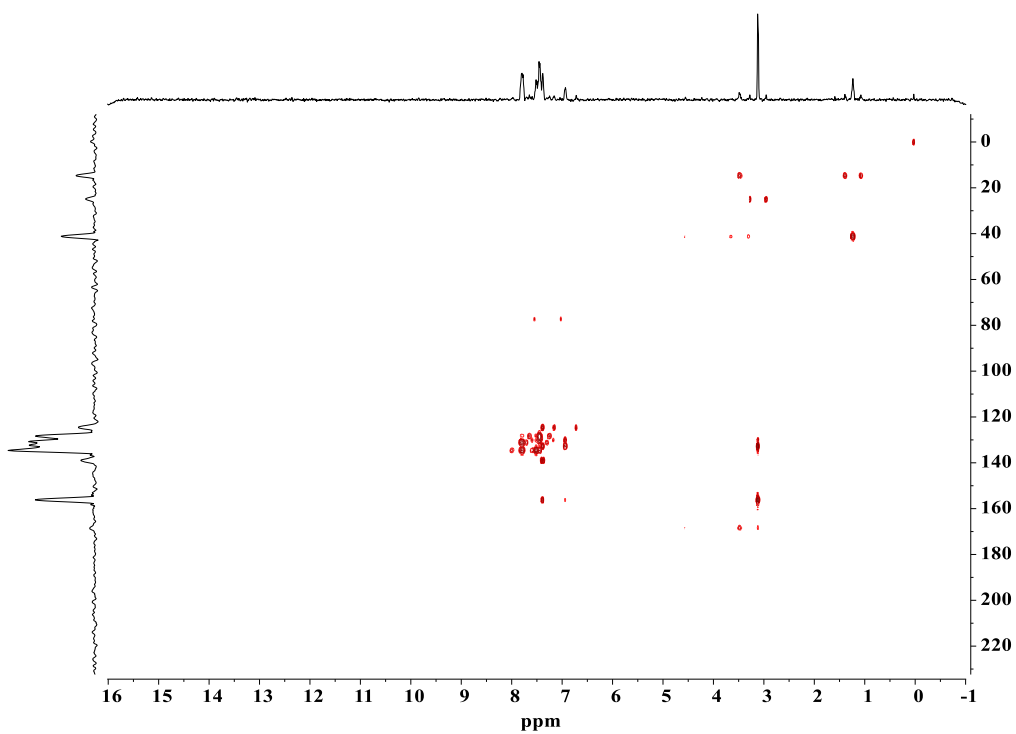


FIGURA A31 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para o complexo PdCl em  $\text{CDCl}_3$ .

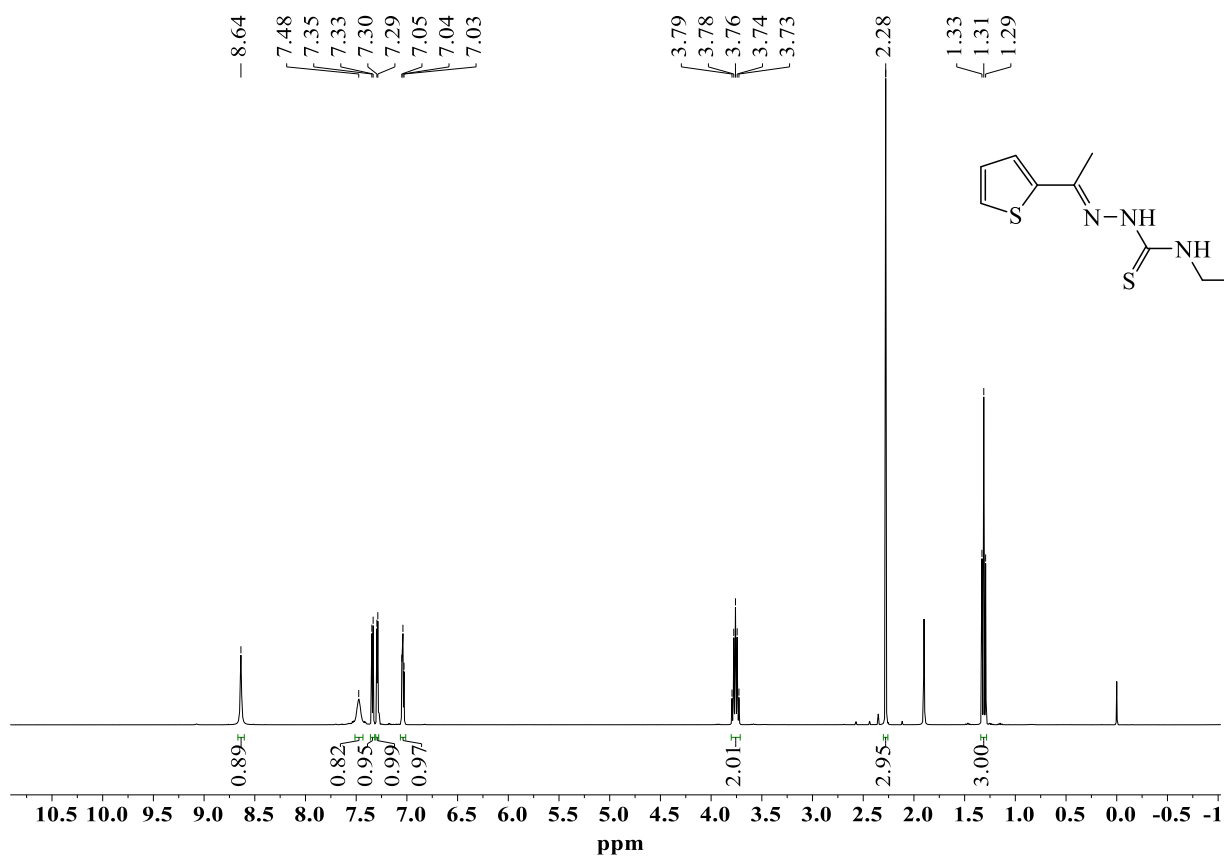


FIGURA A32 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante TET em  $\text{CDCl}_3$ .

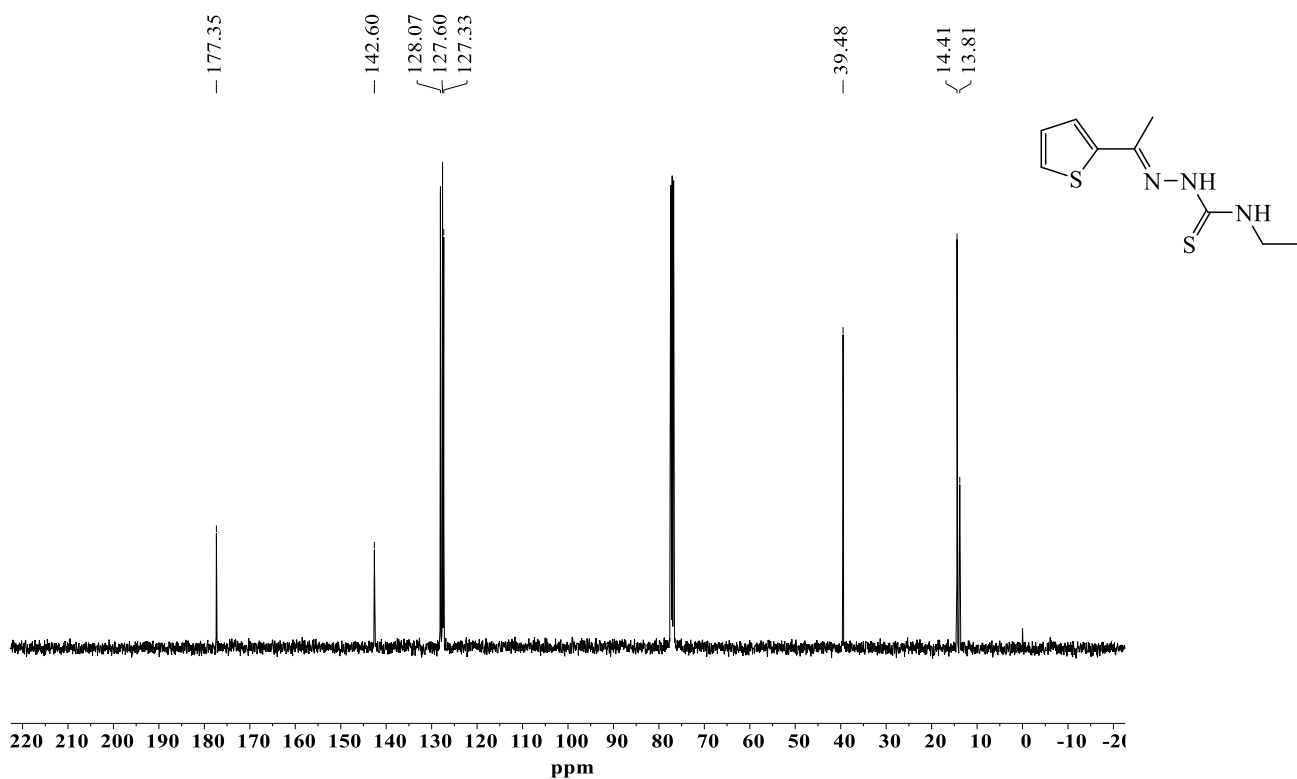


FIGURA A33 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante TET em  $\text{CDCl}_3$ .

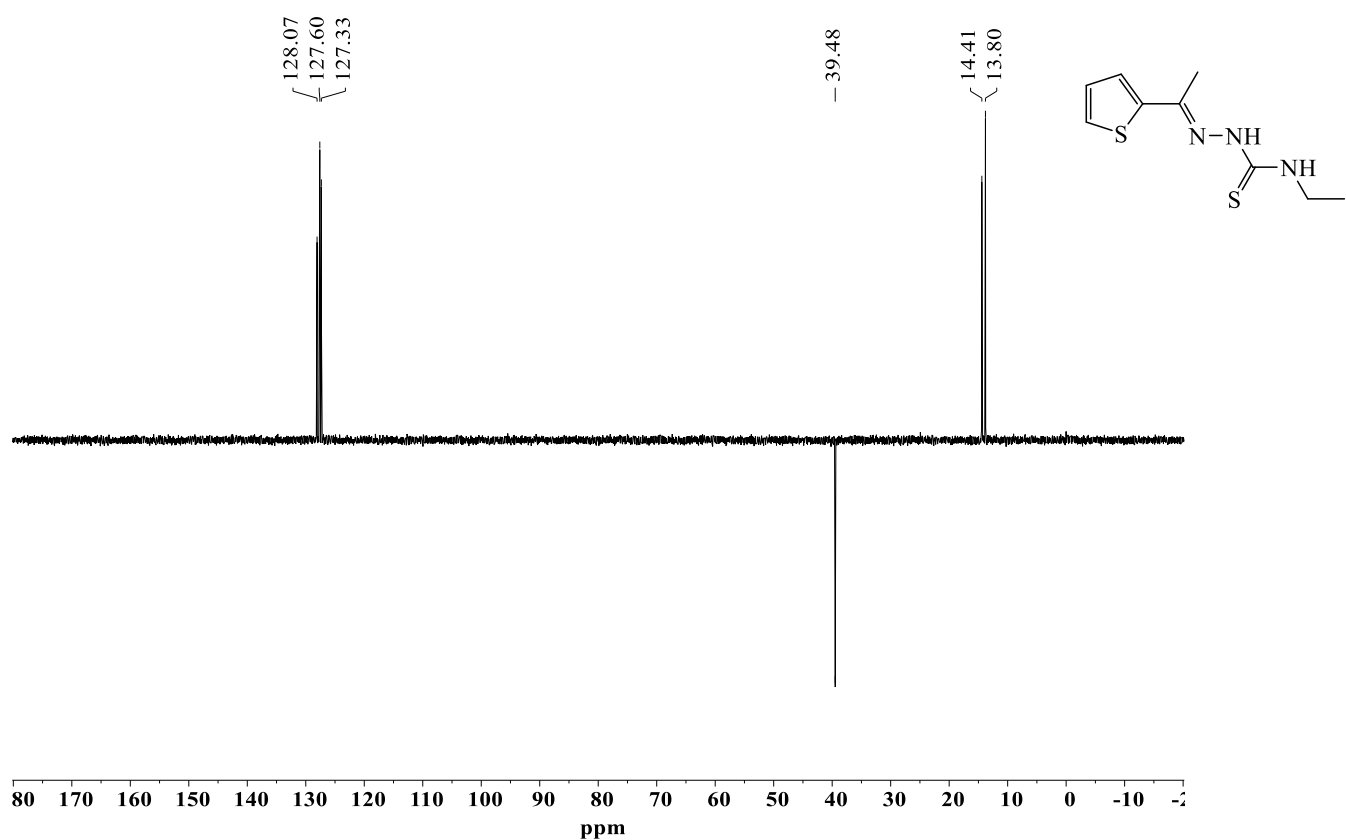


FIGURA A34 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante TET em  $\text{CDCl}_3$ .



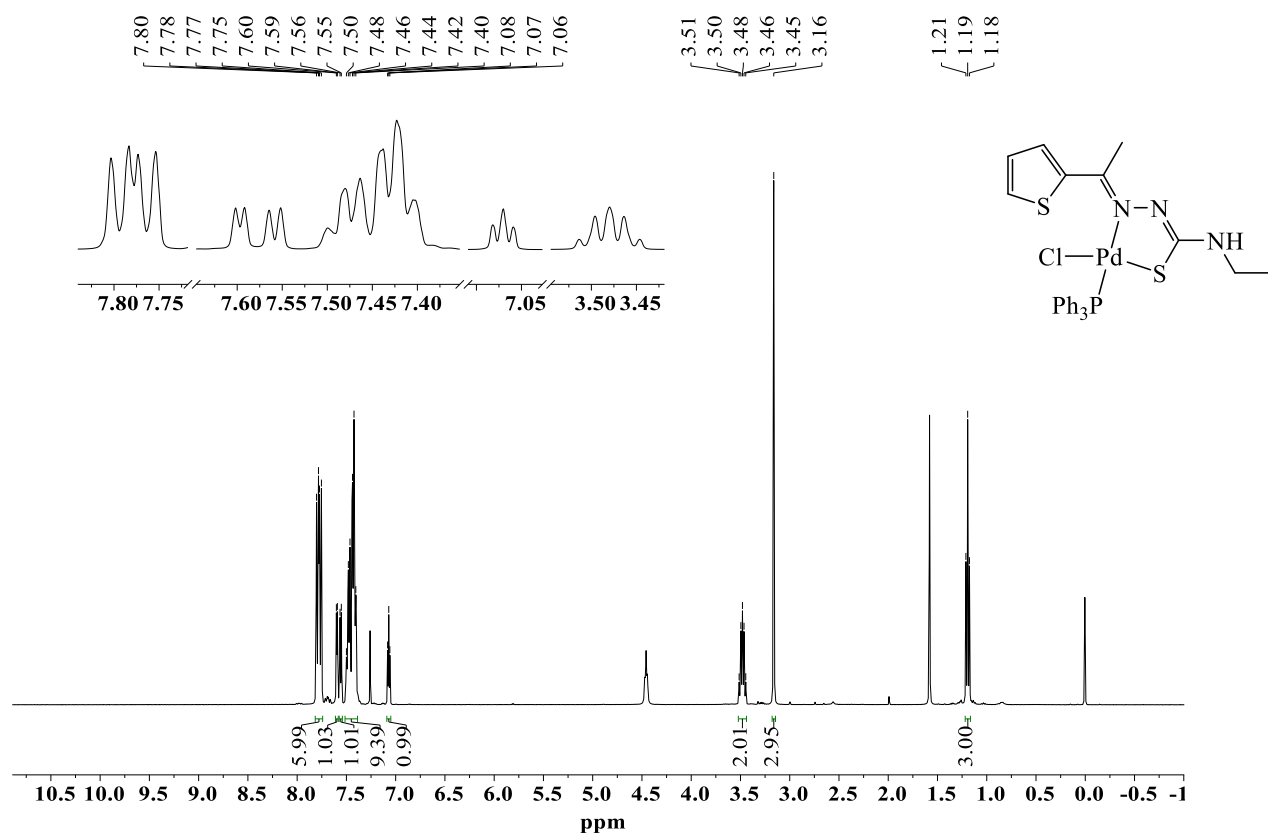


FIGURA A35 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo PdT em CDCl<sub>3</sub>.

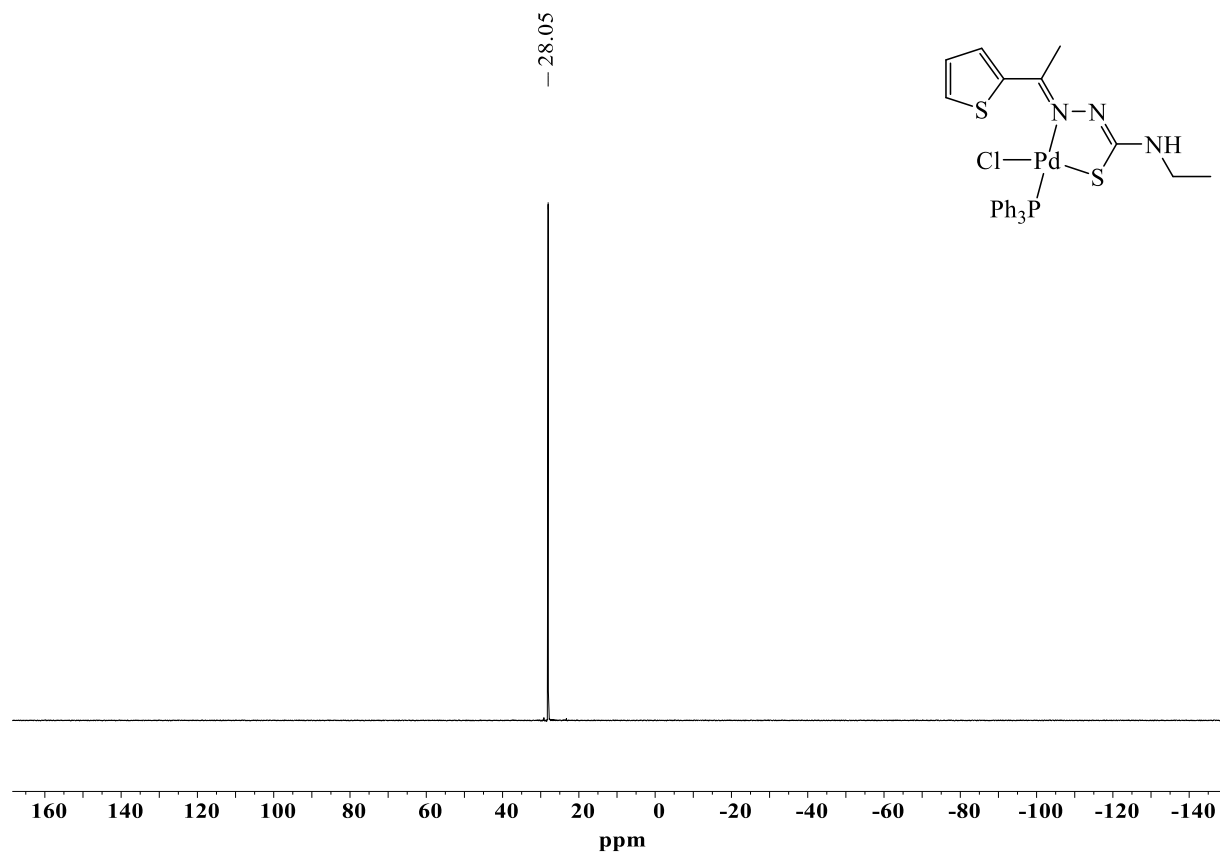


FIGURA A36 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  do complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

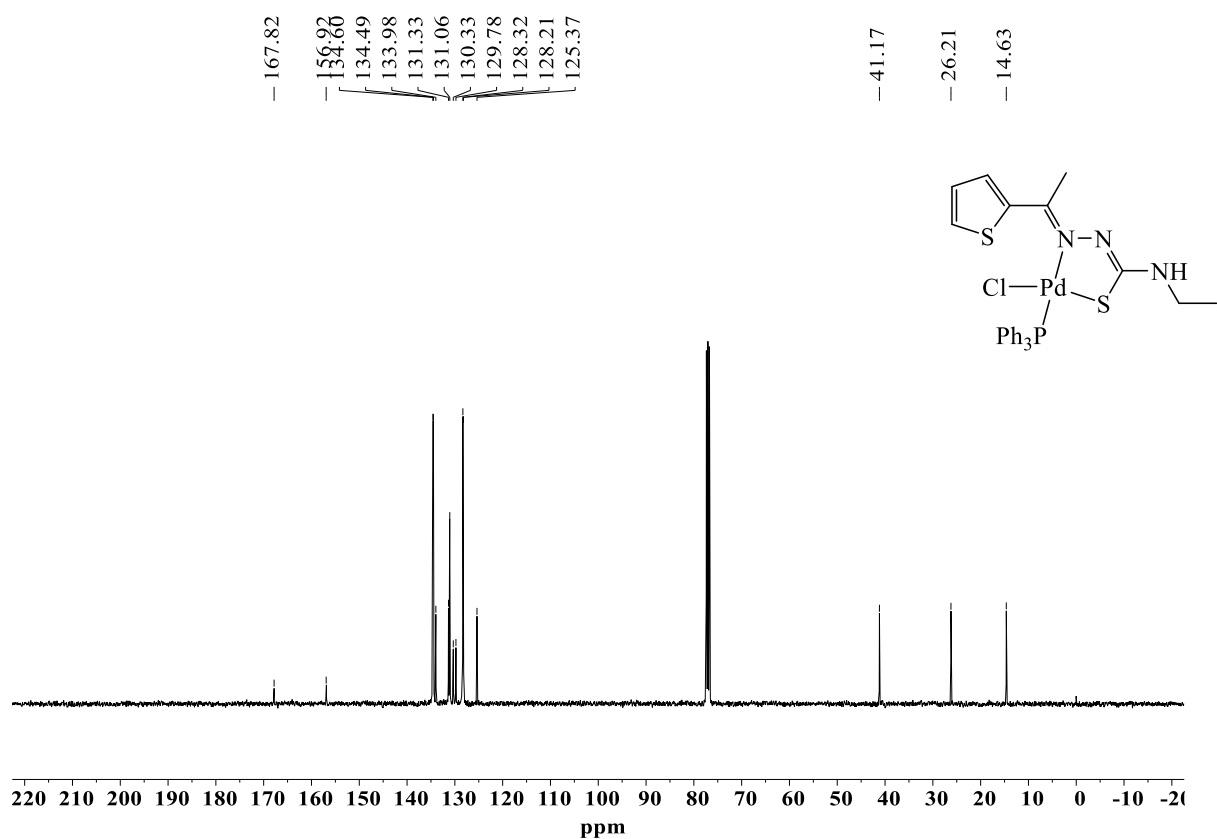


FIGURA A37 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

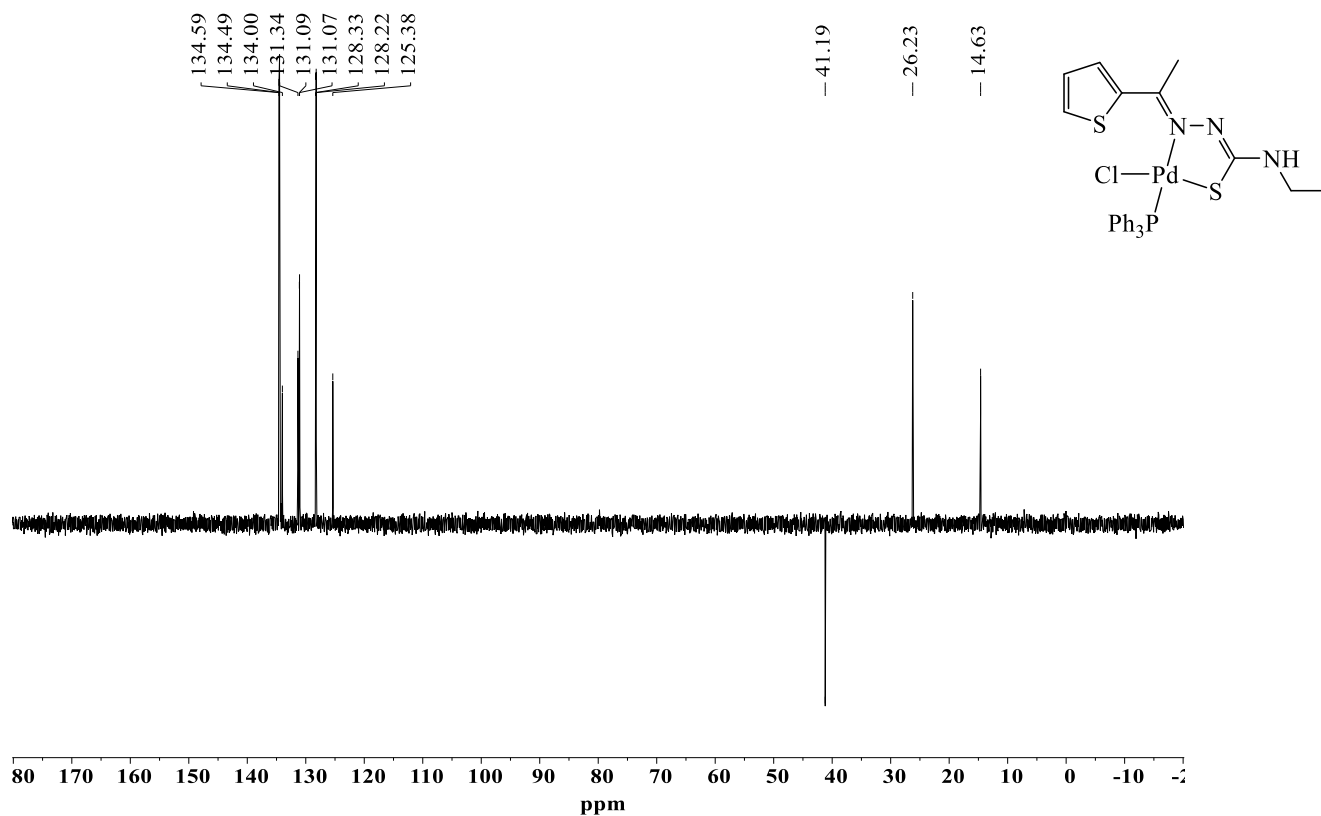


FIGURA A38 - Espectro de RMN DEPT-135 do complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

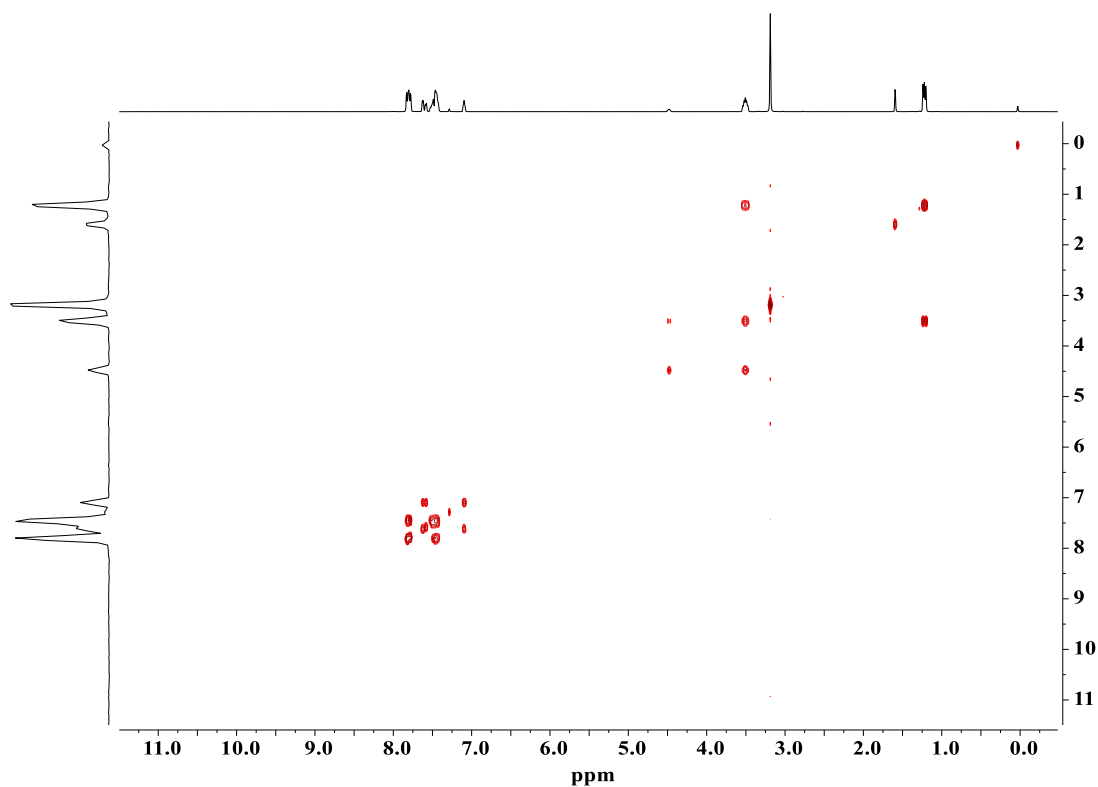


FIGURA A39 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para o complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

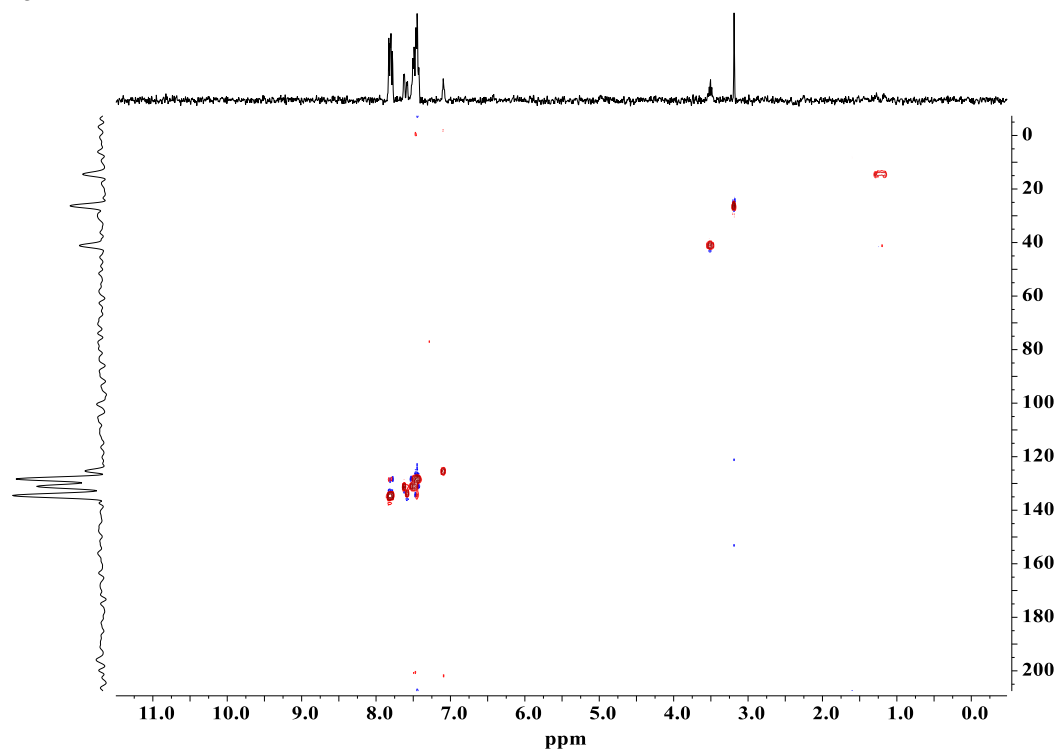


FIGURA A40 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC para o complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

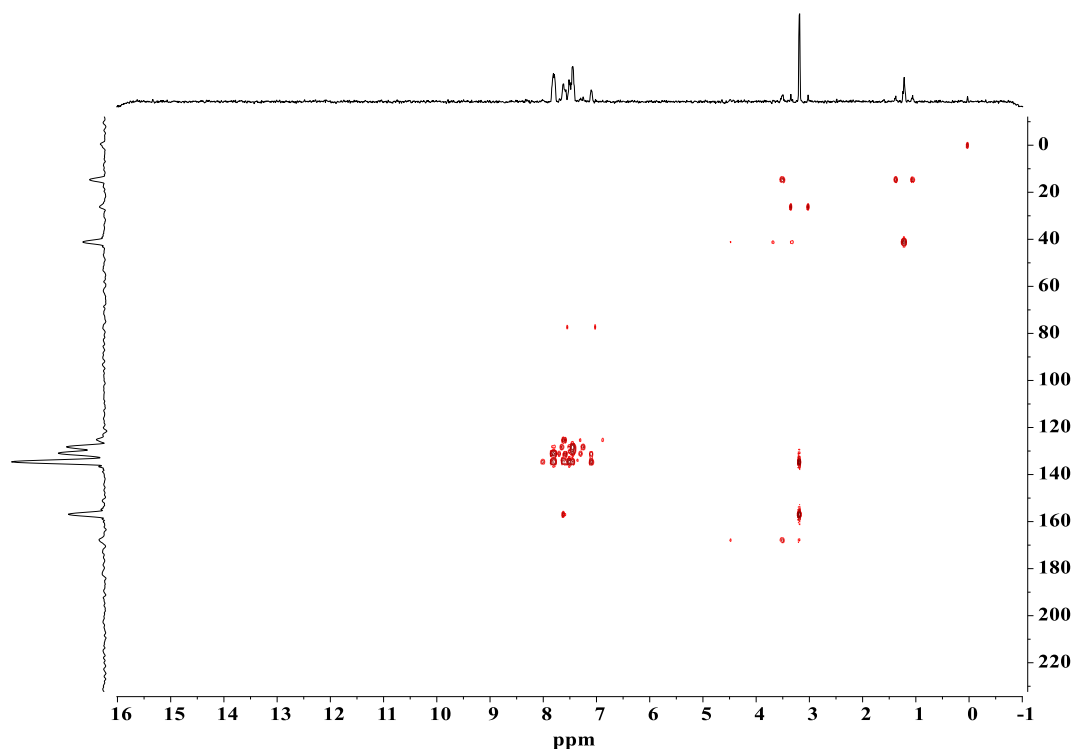


FIGURA A41 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para o complexo PdT em  $\text{CDCl}_3$ .

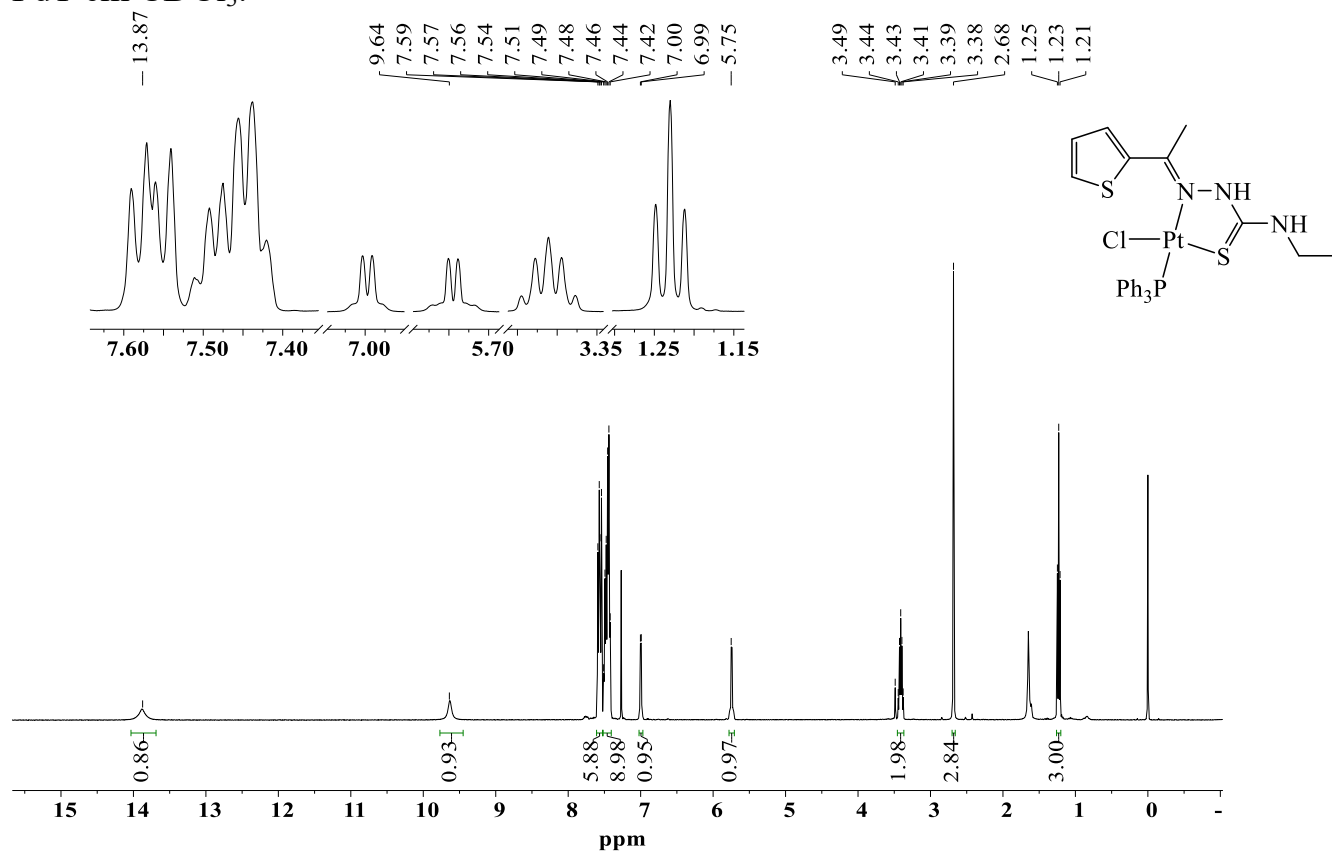


FIGURA A42 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo PtT em  $\text{CDCl}_3$ .

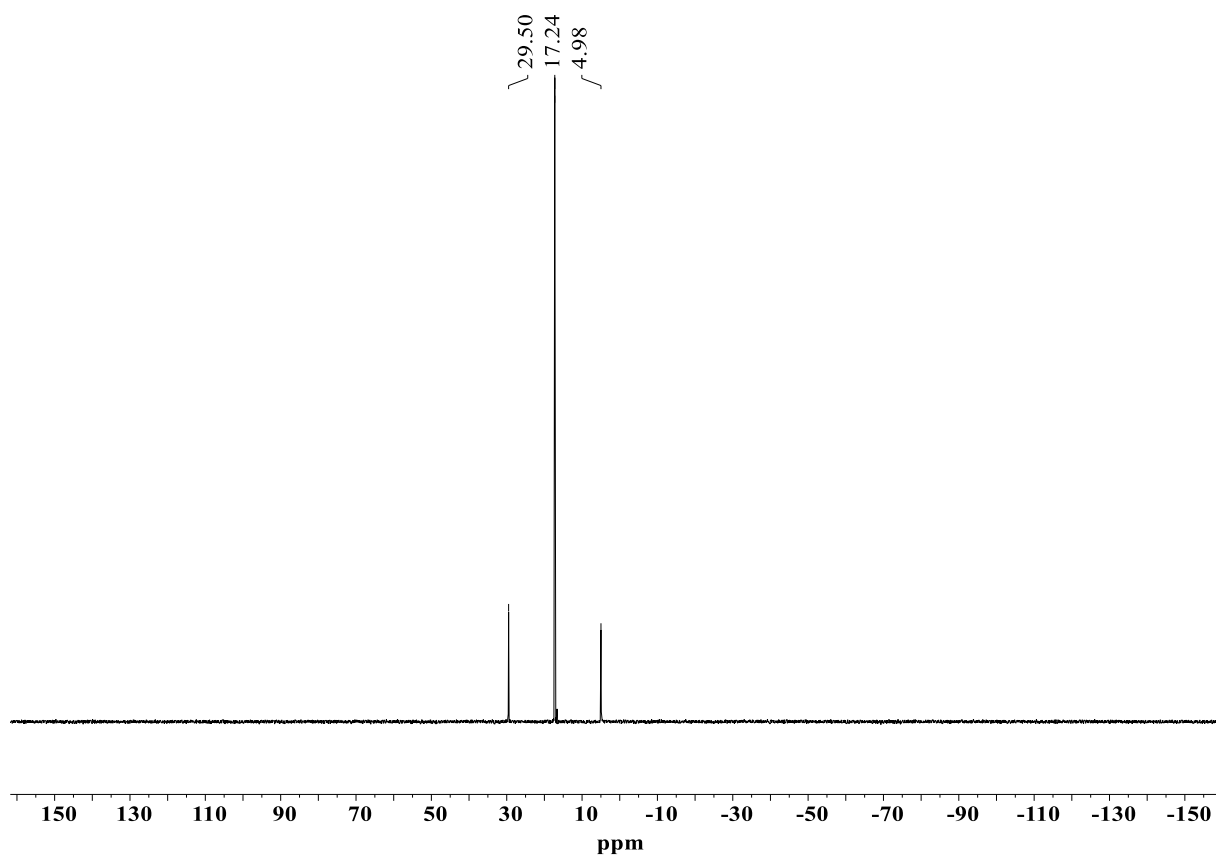


FIGURA A43 - Espectro de RMN <sup>31</sup>P do complexo PtT em CDCl<sub>3</sub>.

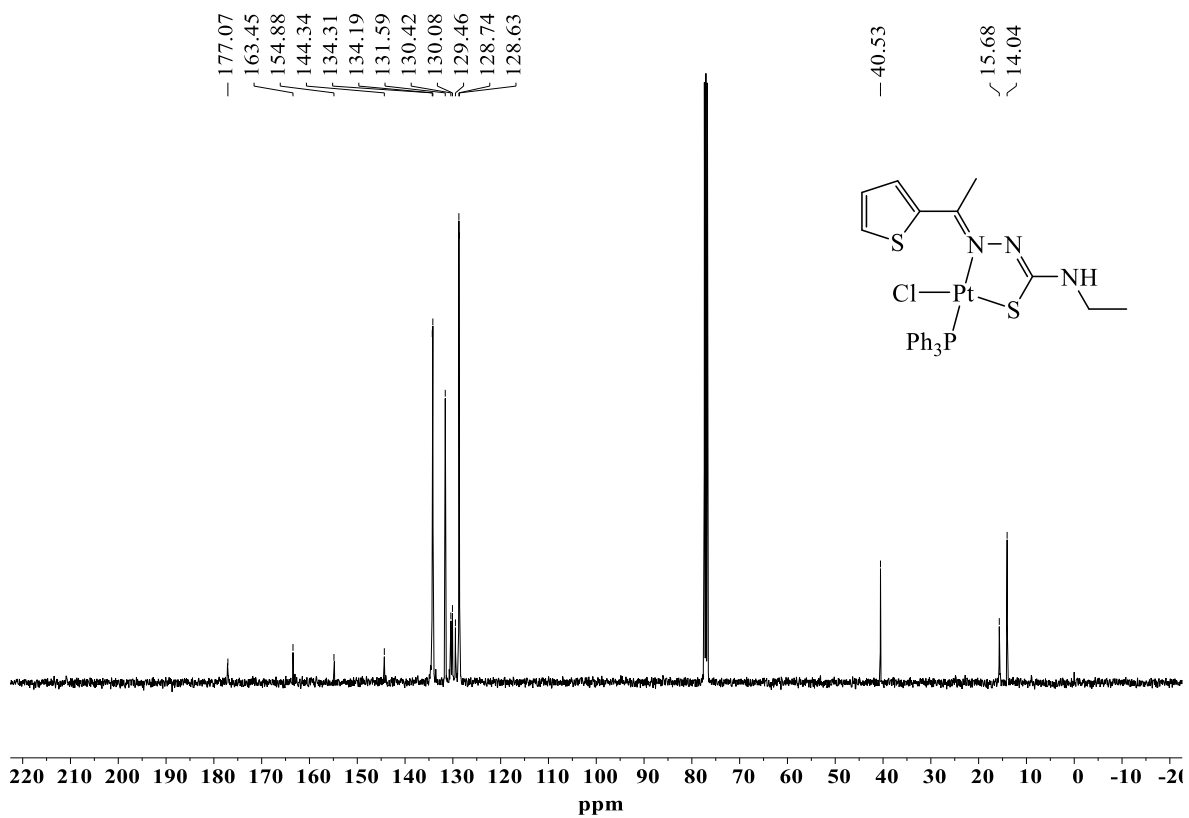


FIGURA A44 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C do complexo PtT em CDCl<sub>3</sub>.

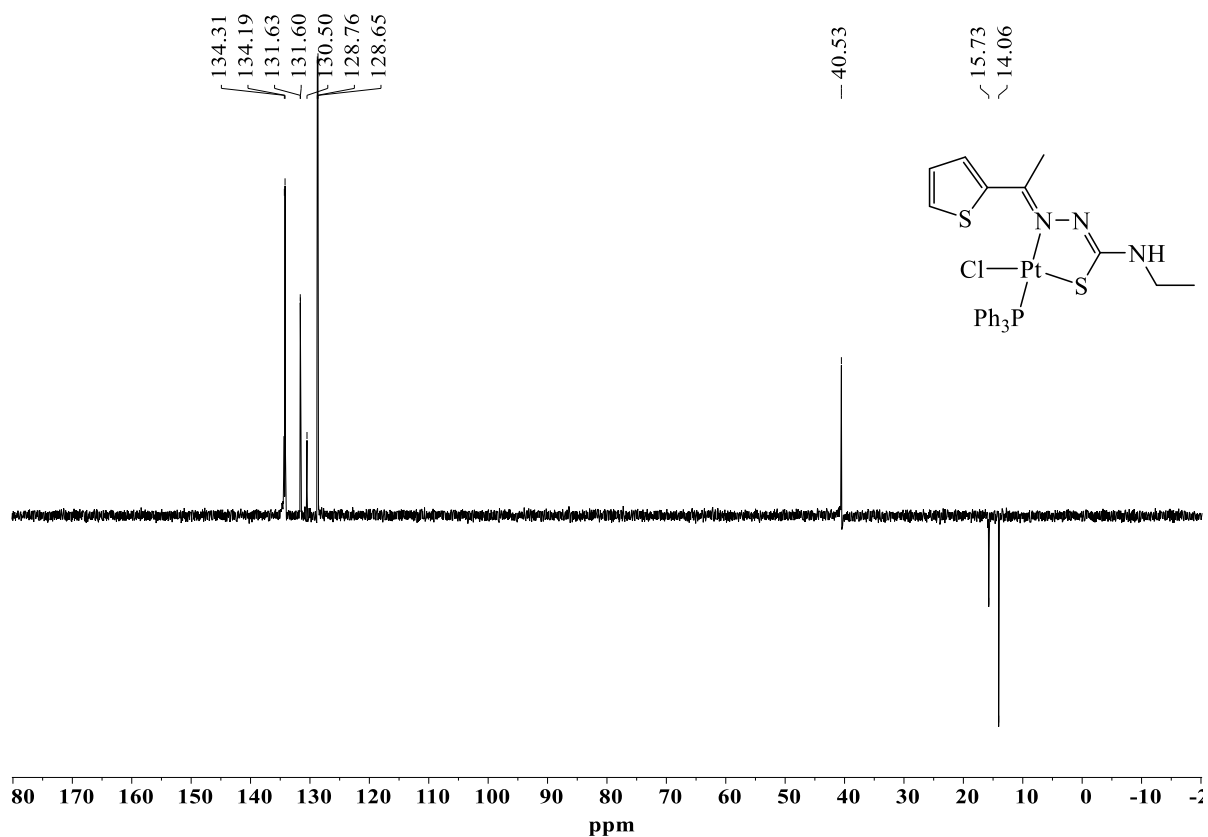


FIGURA A45 - Espectro de RMN DEPT-135 do complexo PtT em CDCl<sub>3</sub>.

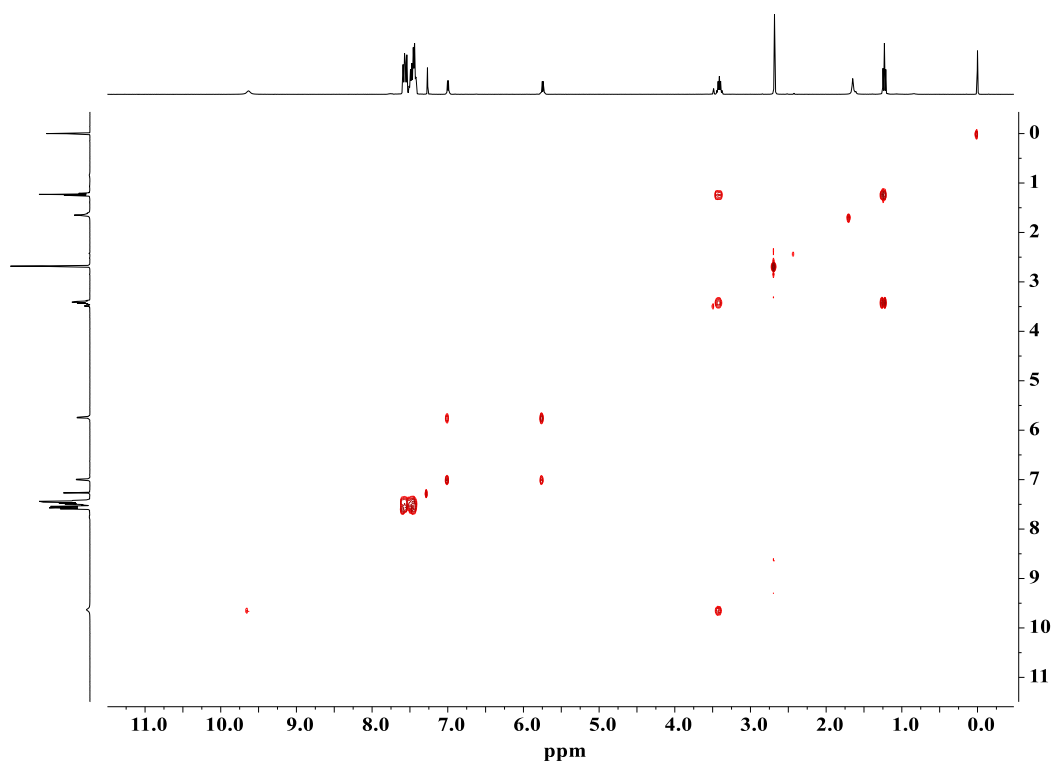


FIGURA A46 - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY para o complexo PtT em CDCl<sub>3</sub>.

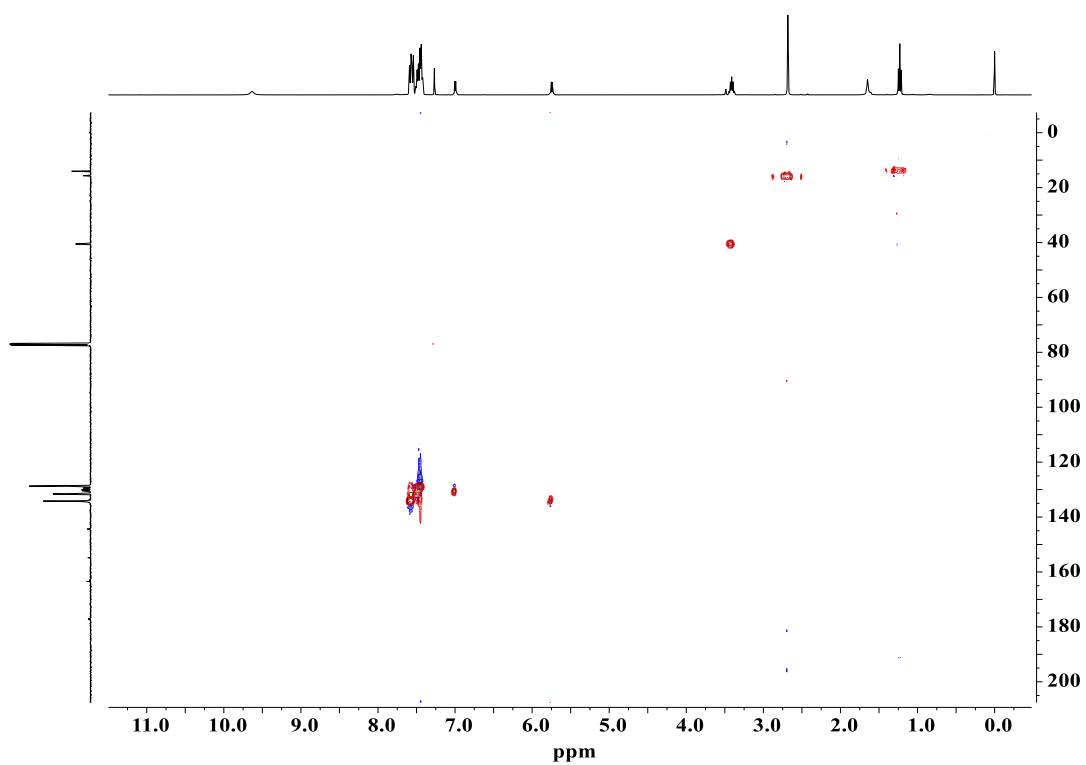


FIGURA A47 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC para o complexo PtT em  $\text{CDCl}_3$ .

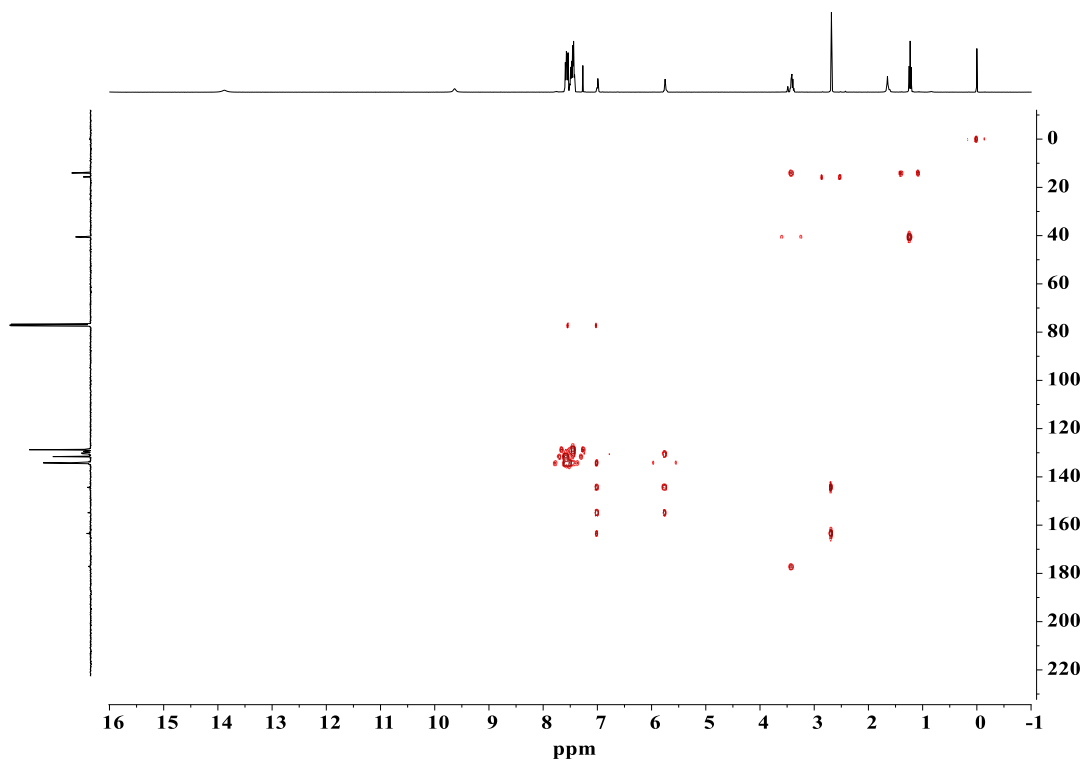


FIGURA A48 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para o complexo PtT em  $\text{CDCl}_3$ .

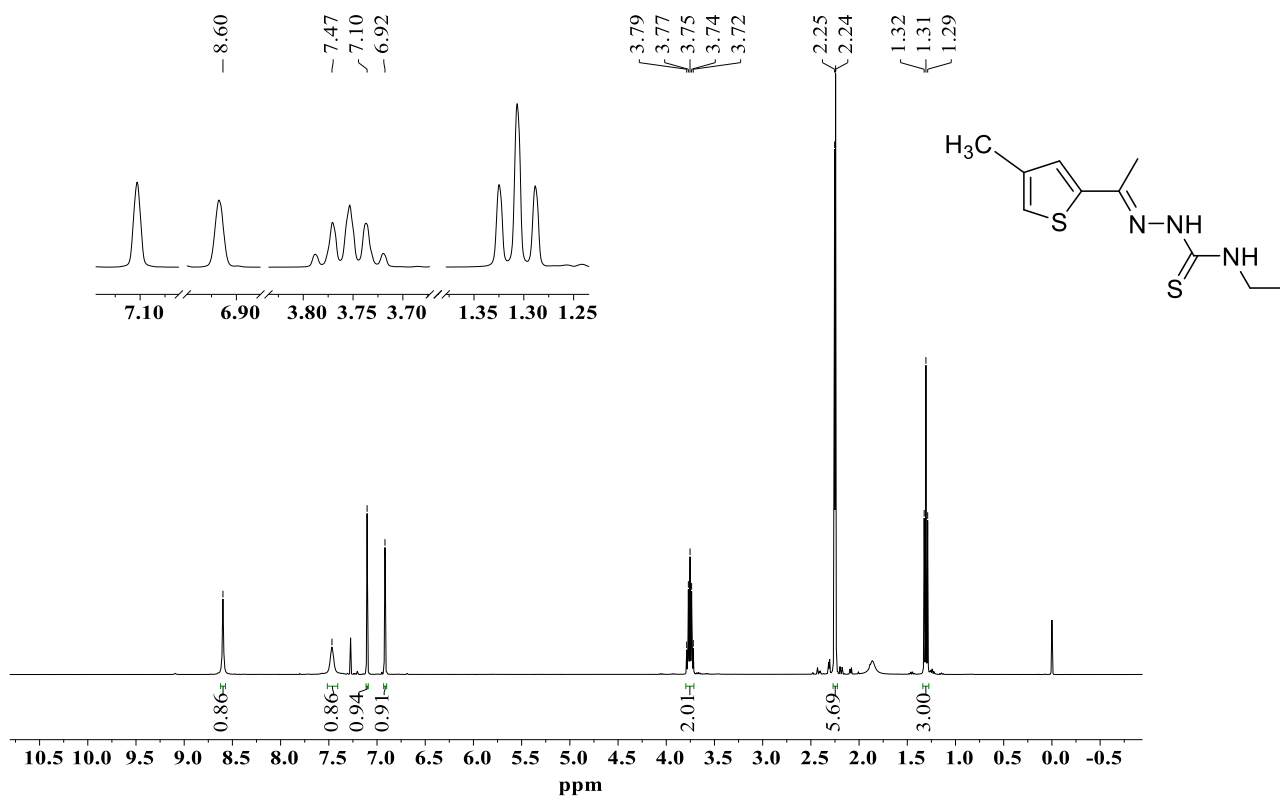


FIGURA A49 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante MTET em  $\text{CDCl}_3$ .

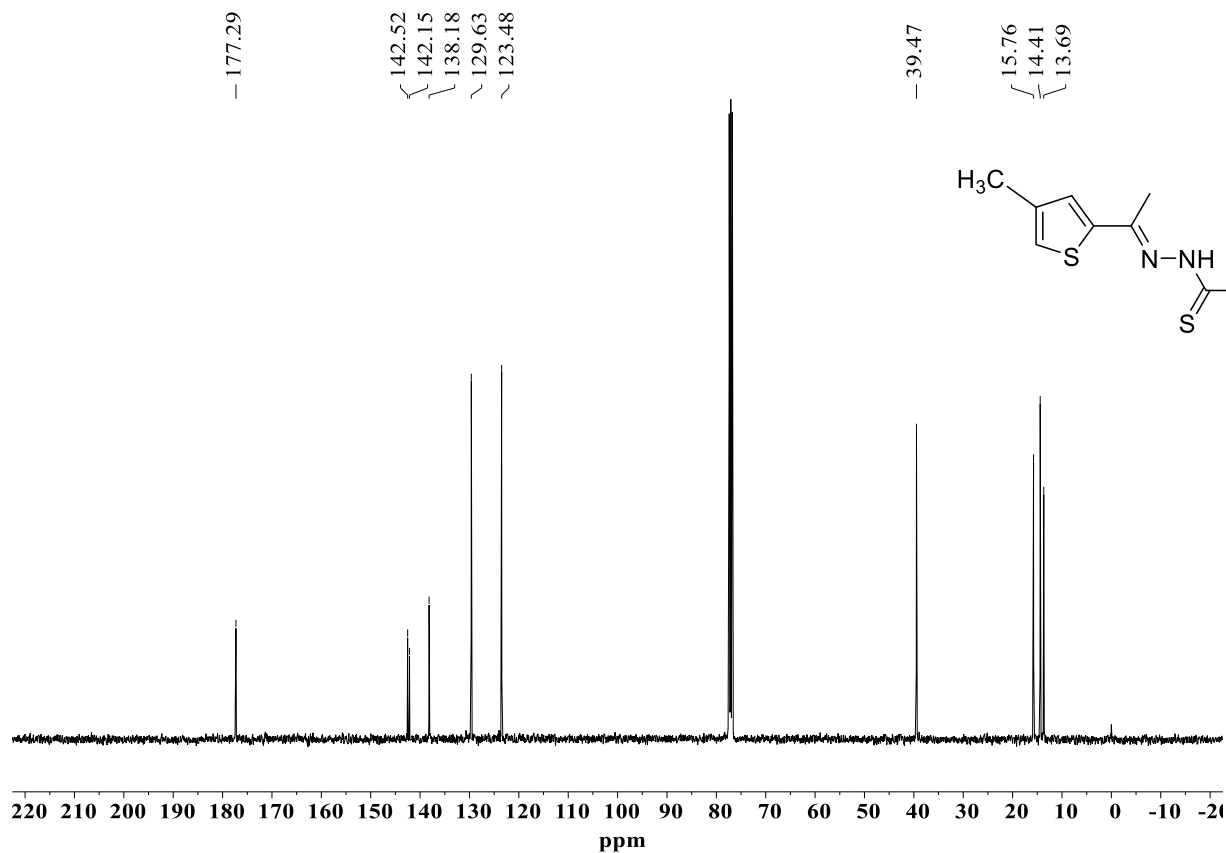


FIGURA A50 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante MTET em  $\text{CDCl}_3$ .



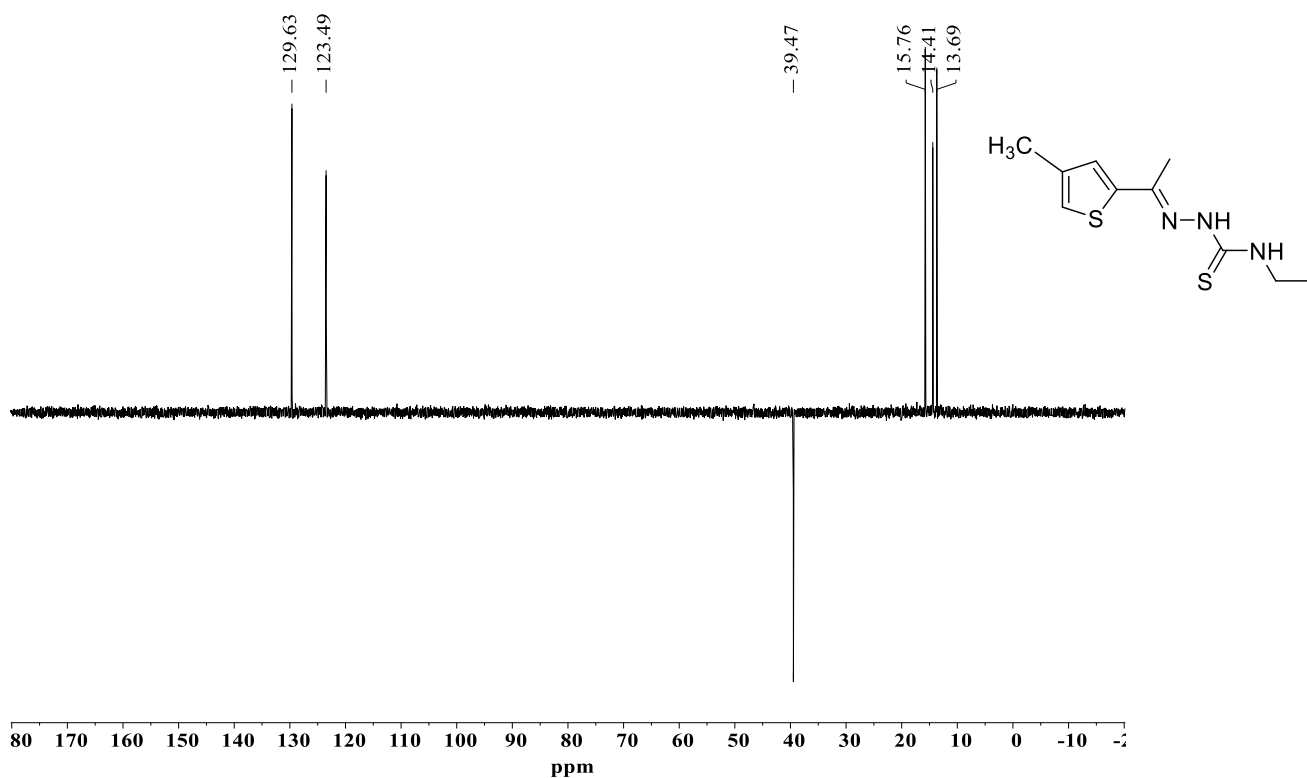


FIGURA A51 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante MTET em  $\text{CDCl}_3$ .

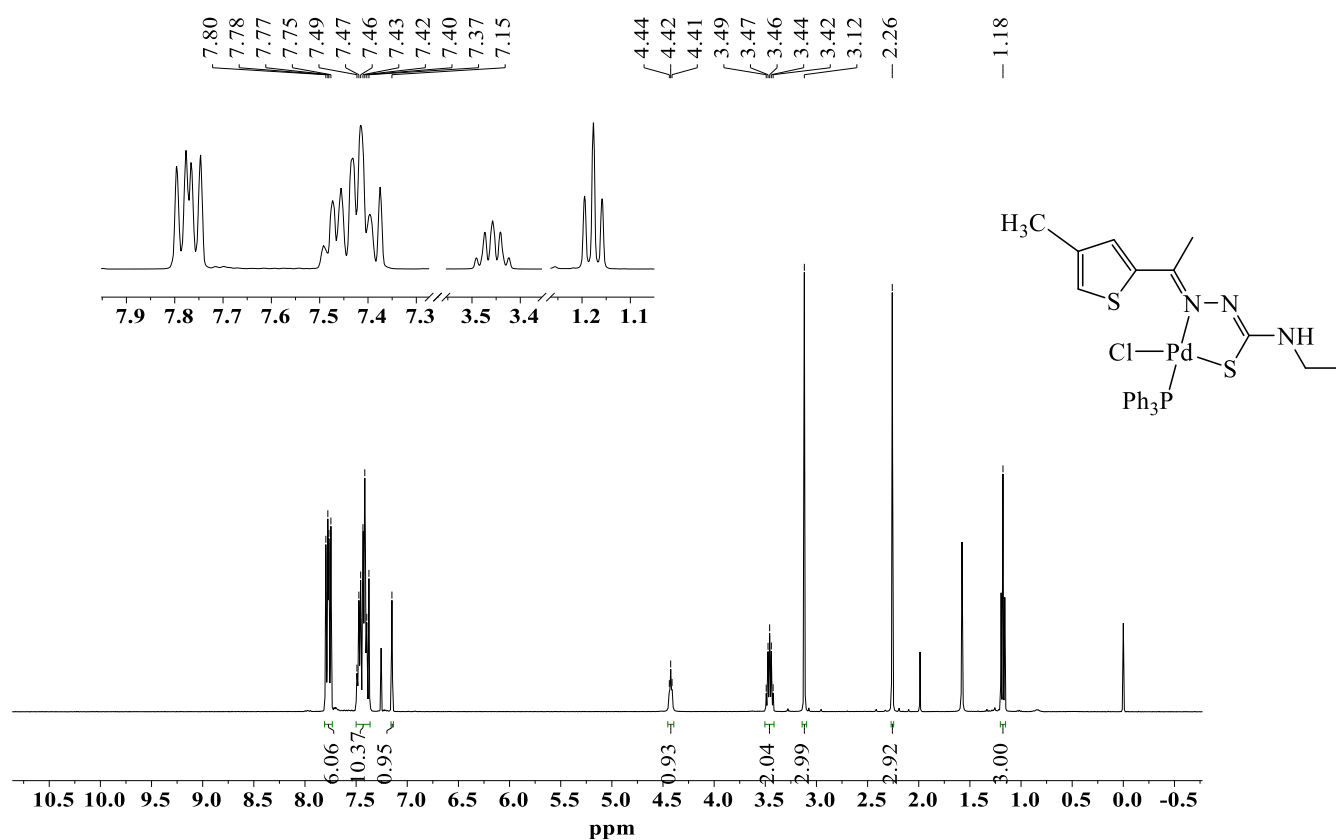


FIGURA A52 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $\text{PdCH}_3$  em  $\text{CDCl}_3$ .

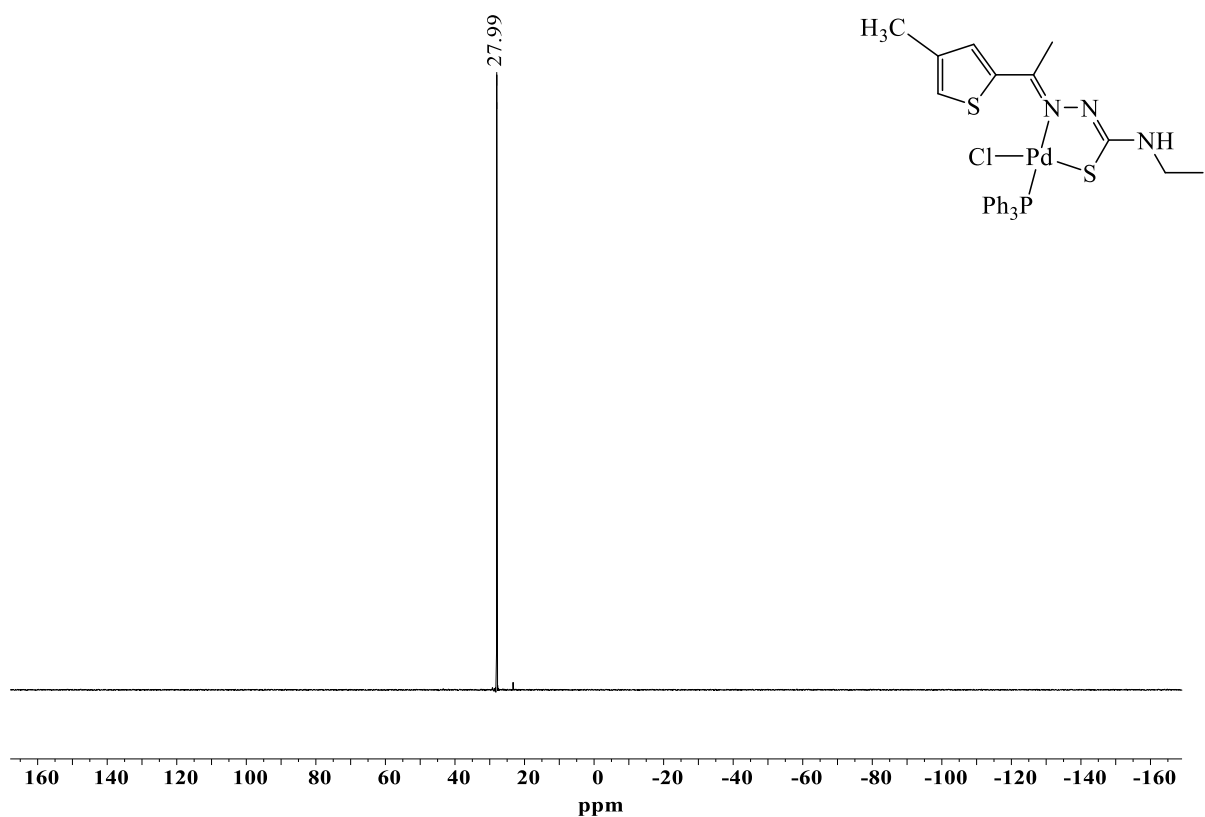


FIGURA A53 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  do complexo PdCH<sub>3</sub> em CDCl<sub>3</sub>.

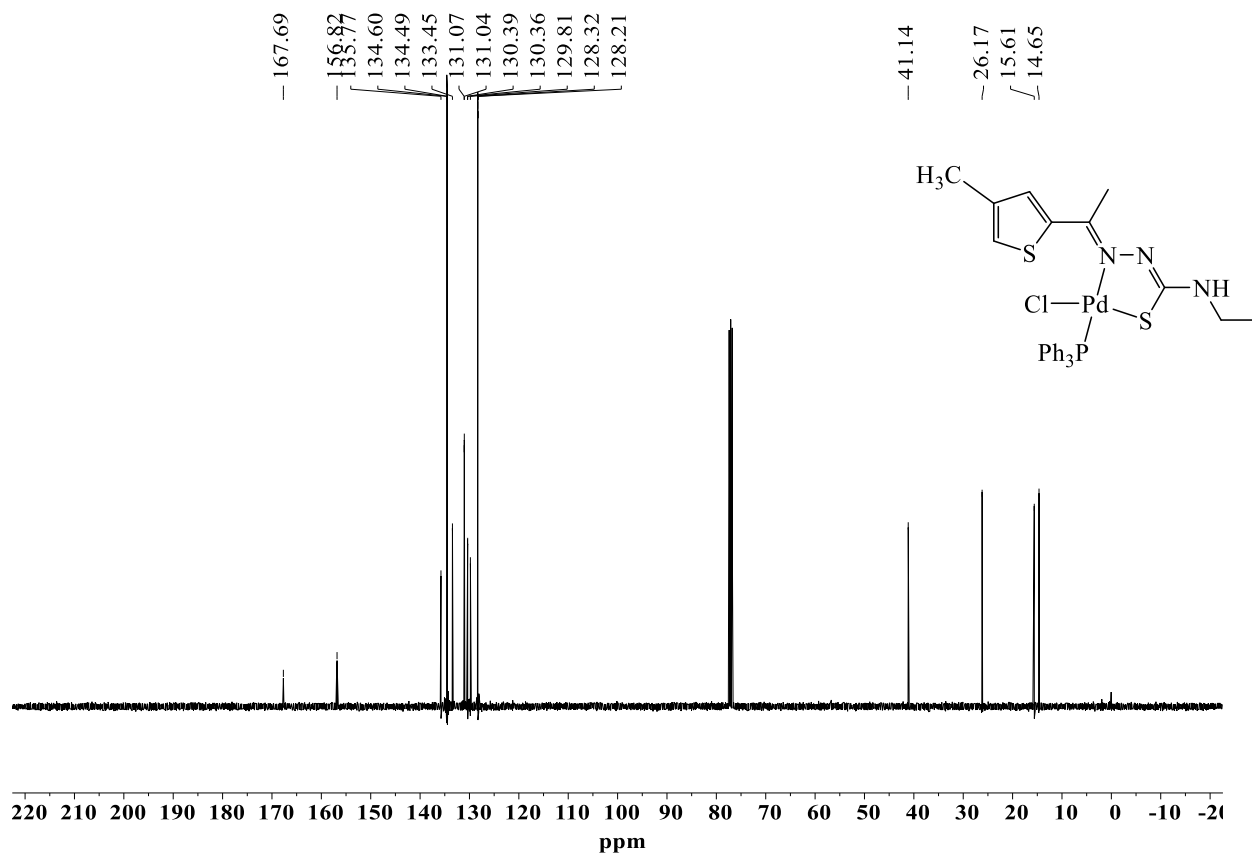


FIGURA A54 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do complexo PdCH<sub>3</sub> em CDCl<sub>3</sub>.

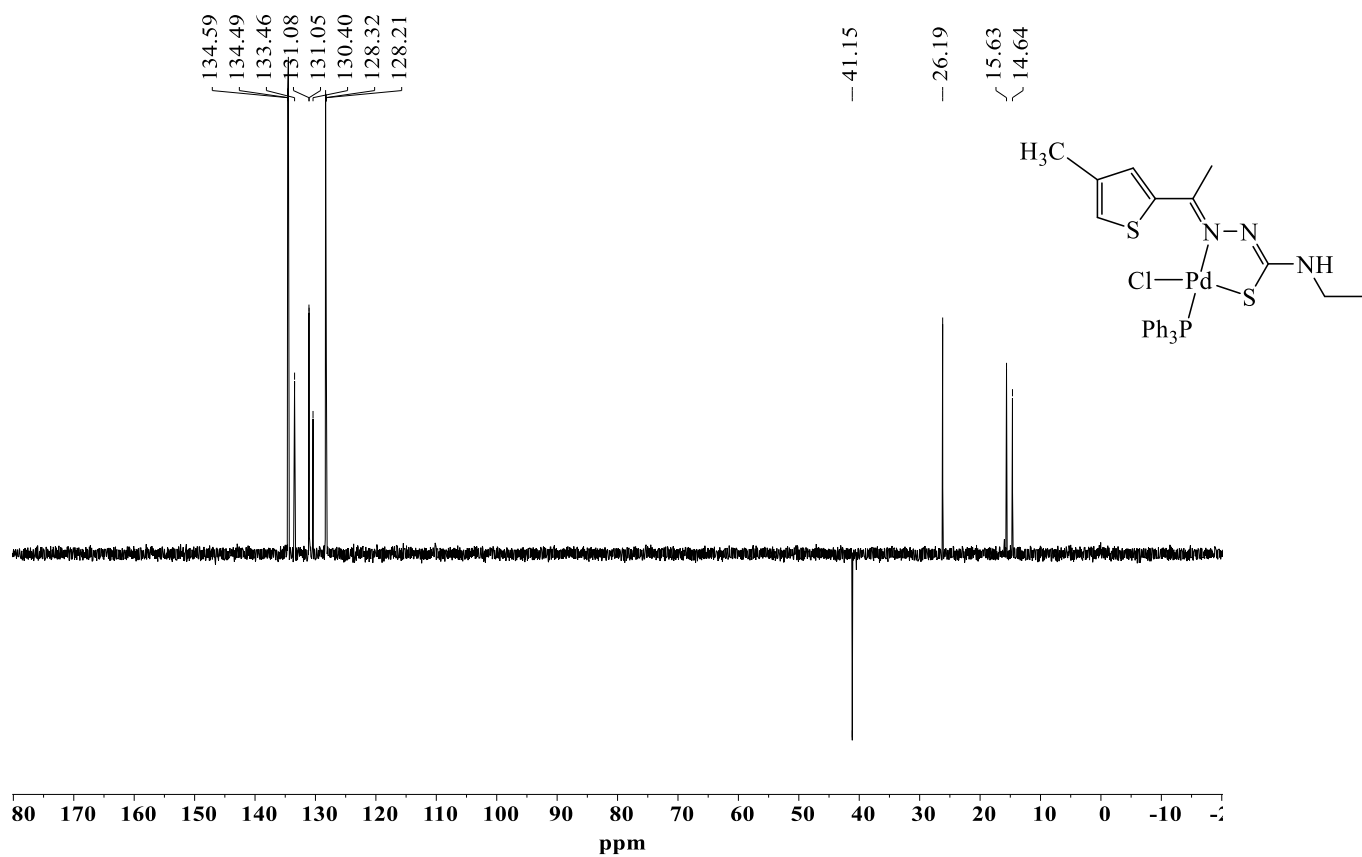


FIGURA A55 - Espectro de RMN DEPT-135 do complexo PdCH<sub>3</sub> em CDCl<sub>3</sub>.

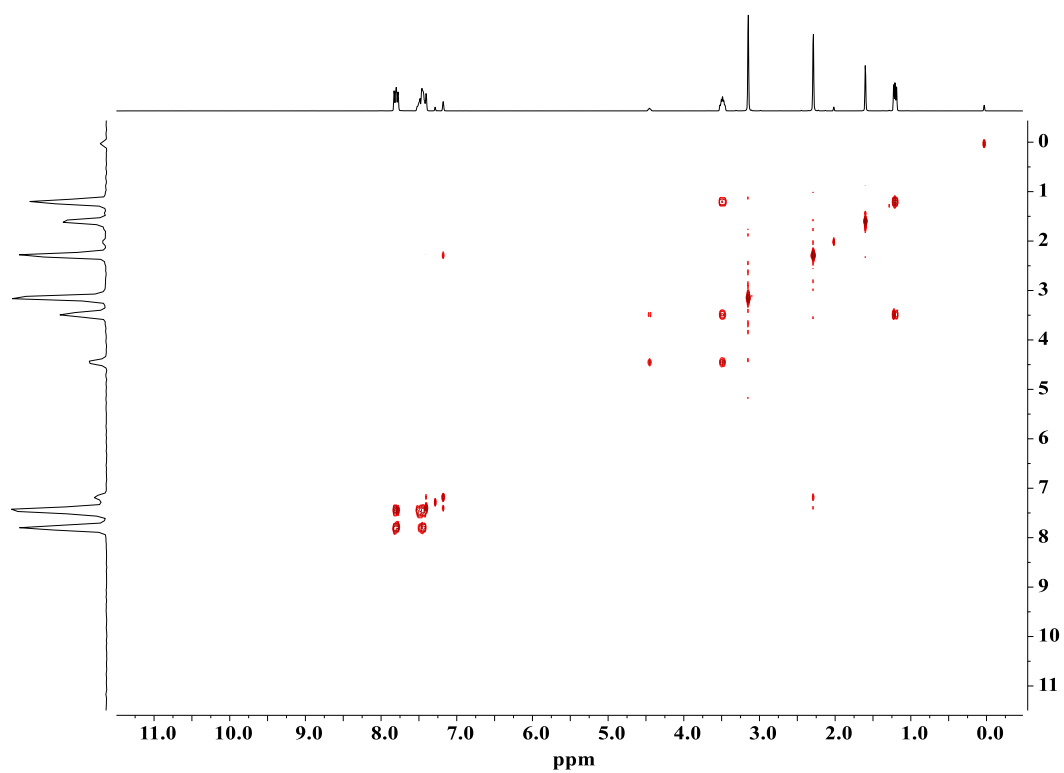


FIGURA A56 - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY para o complexo PdCH<sub>3</sub> em CDCl<sub>3</sub>.

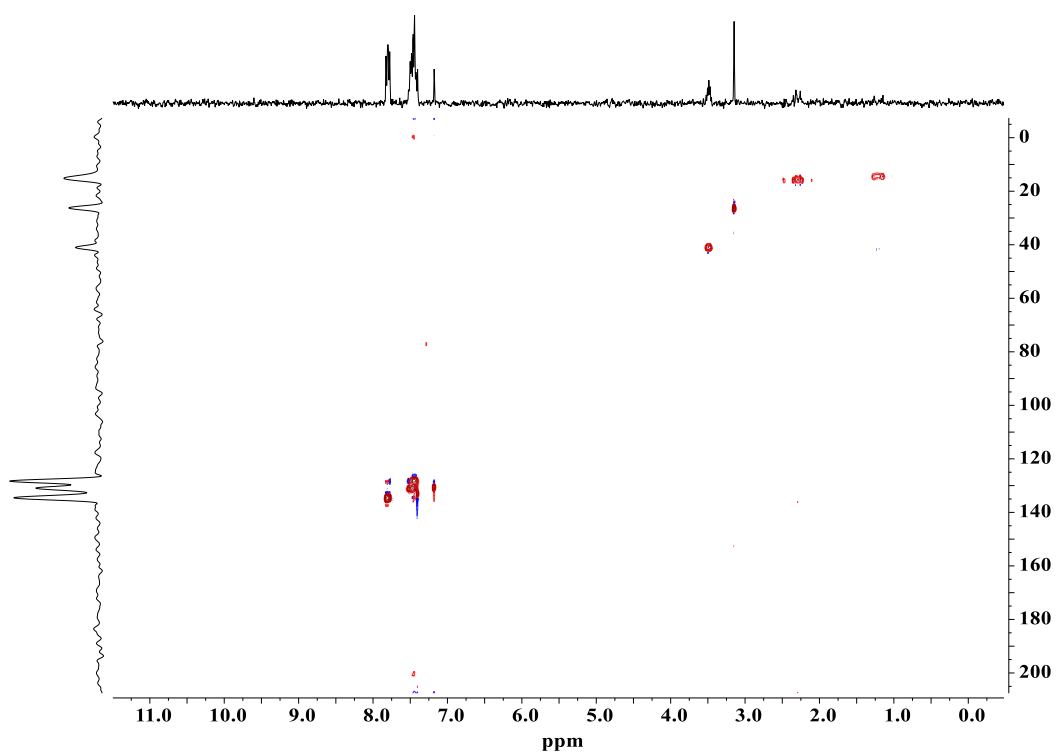


FIGURA A57 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC para o complexo  $\text{PdCH}_3$  em  $\text{CDCl}_3$ .

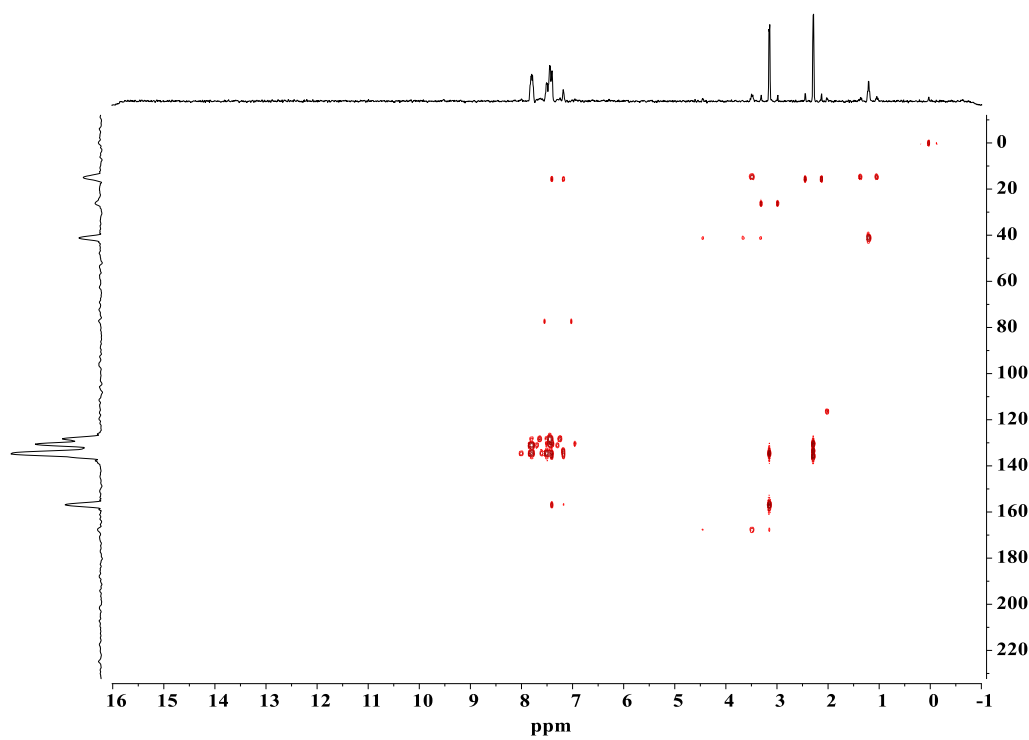


FIGURA A58 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para o complexo  $\text{PdCH}_3$  em  $\text{CDCl}_3$ .

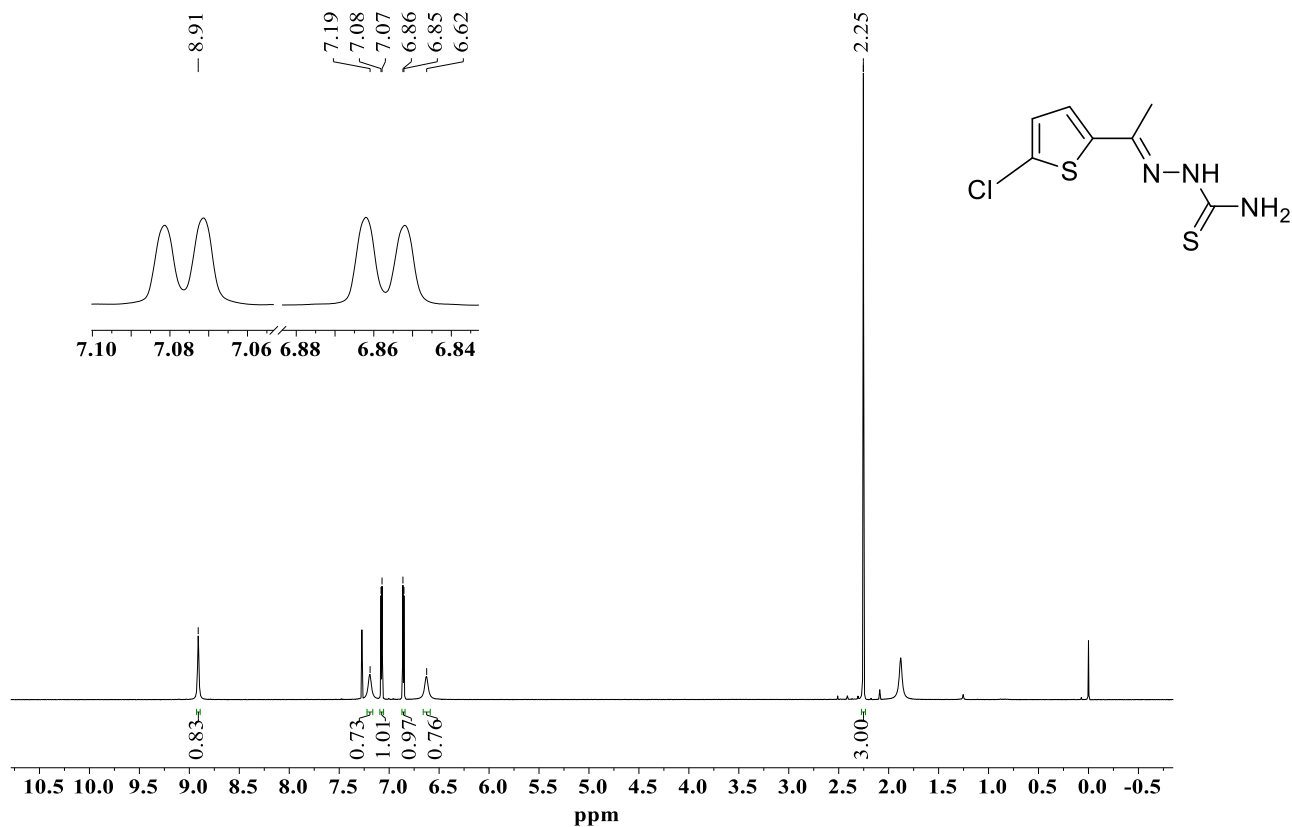


FIGURA A59 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante CLT em  $\text{CDCl}_3$ .

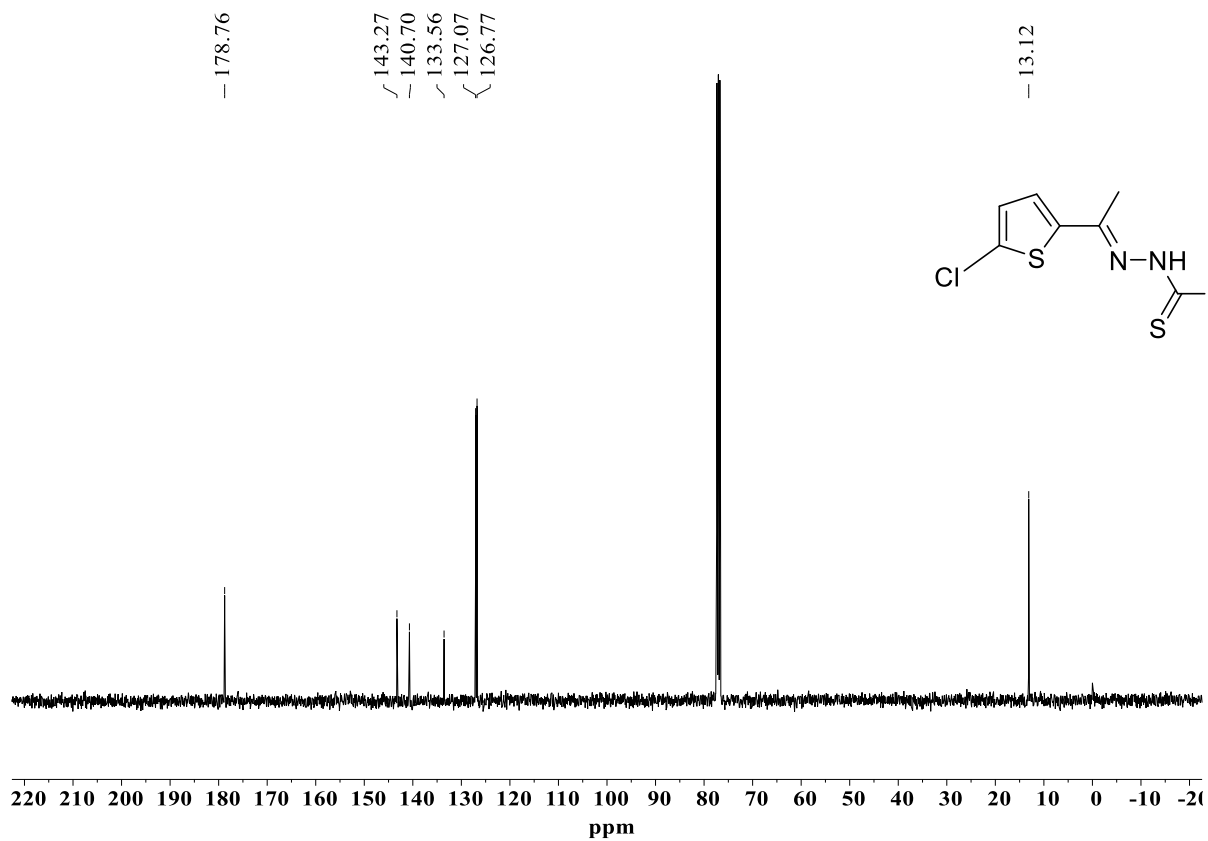


FIGURA A60 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante CLT em  $\text{CDCl}_3$ .

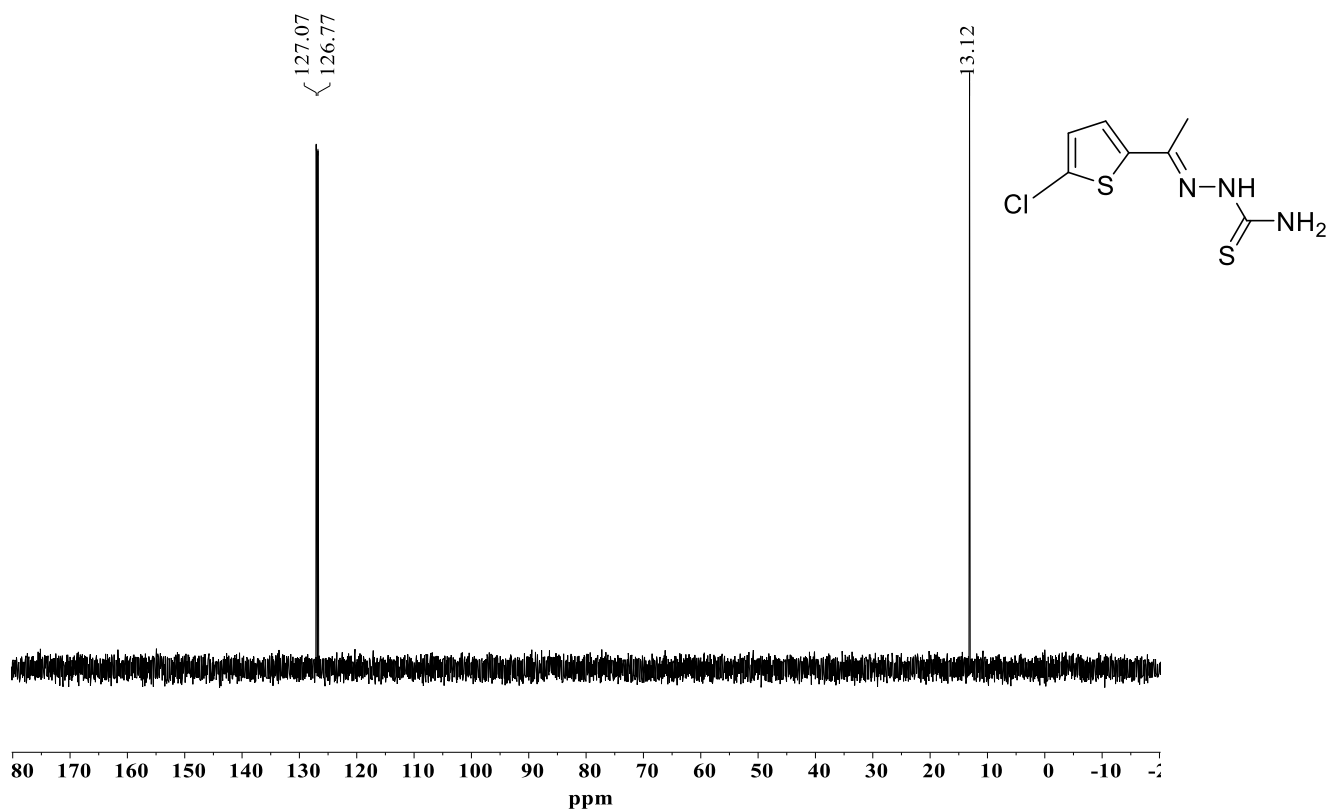


FIGURA A61 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante CLT em  $\text{CDCl}_3$ .

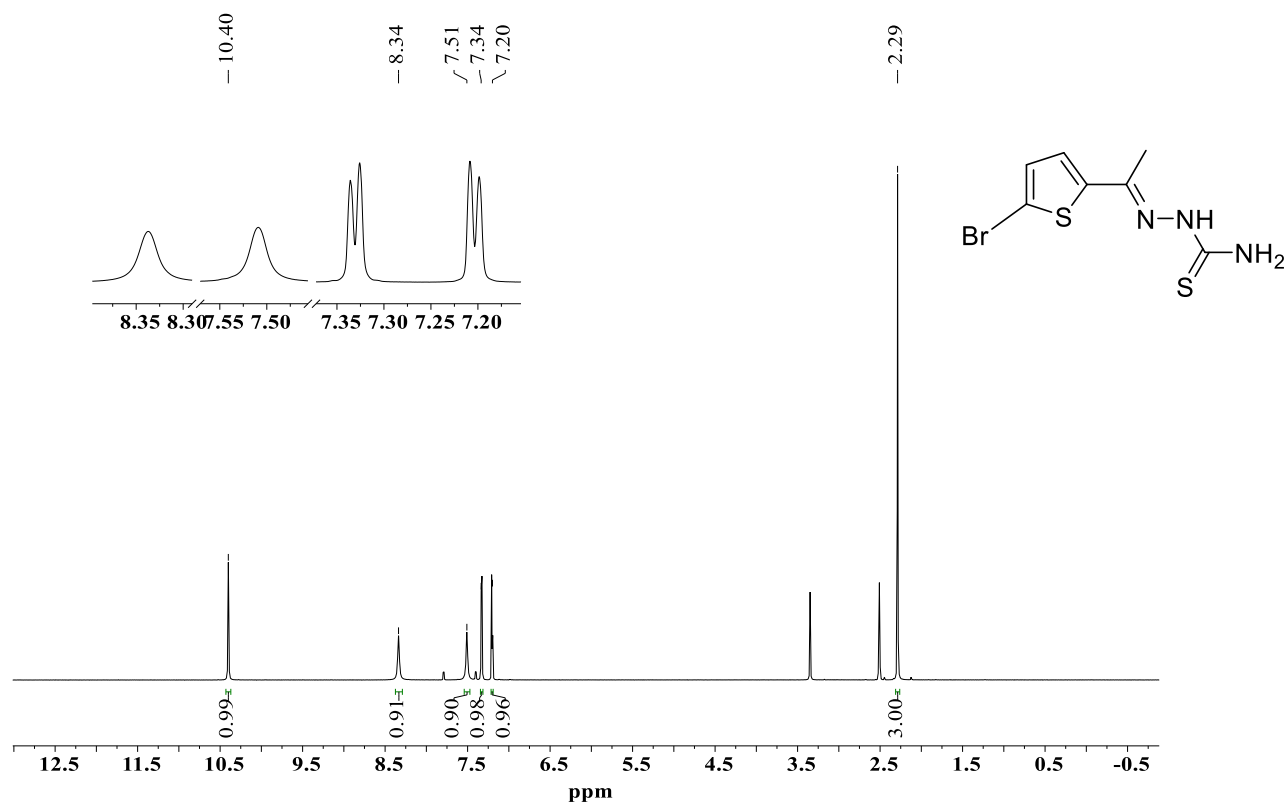


FIGURA A62 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante BRT em  $\text{DMSO}-d^6$ .

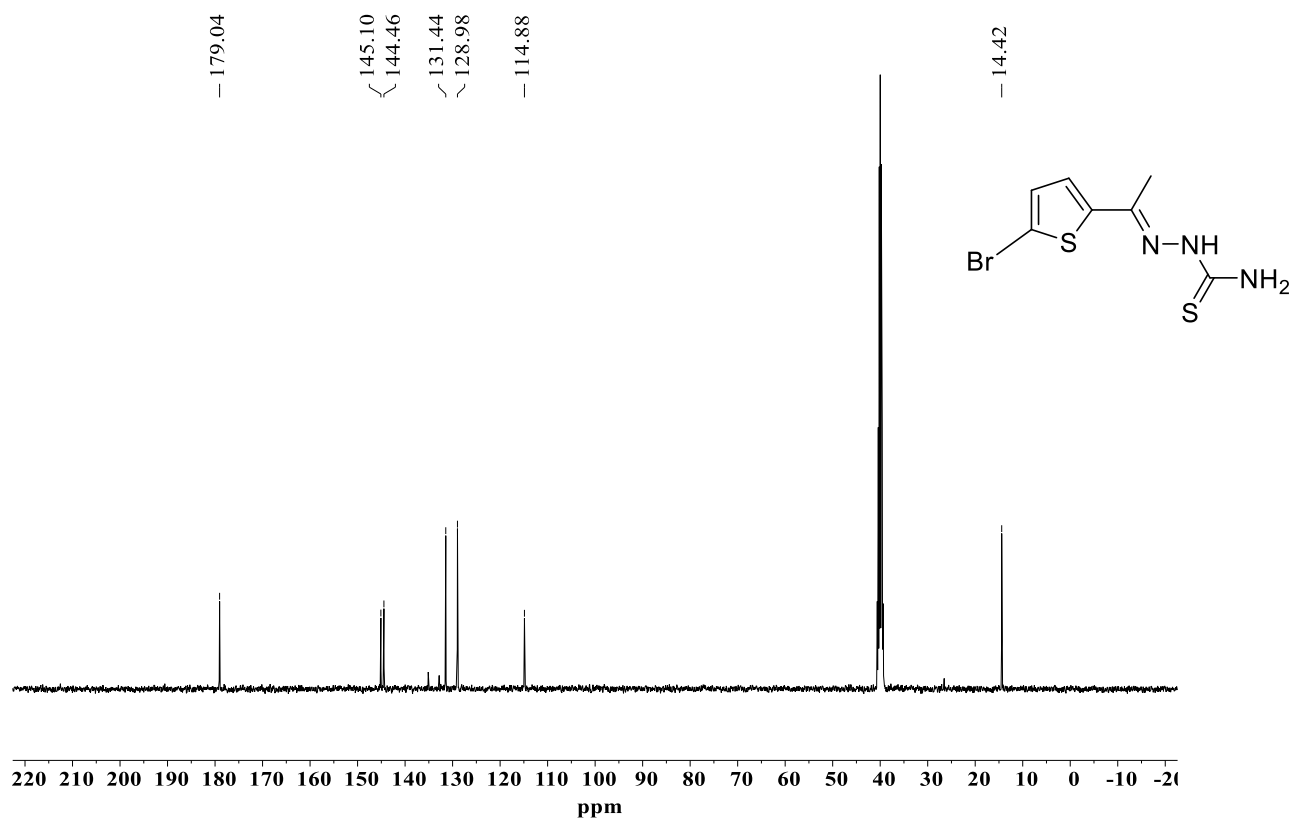


FIGURA A63 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante BRT em  $\text{DMSO} - d^6$ .

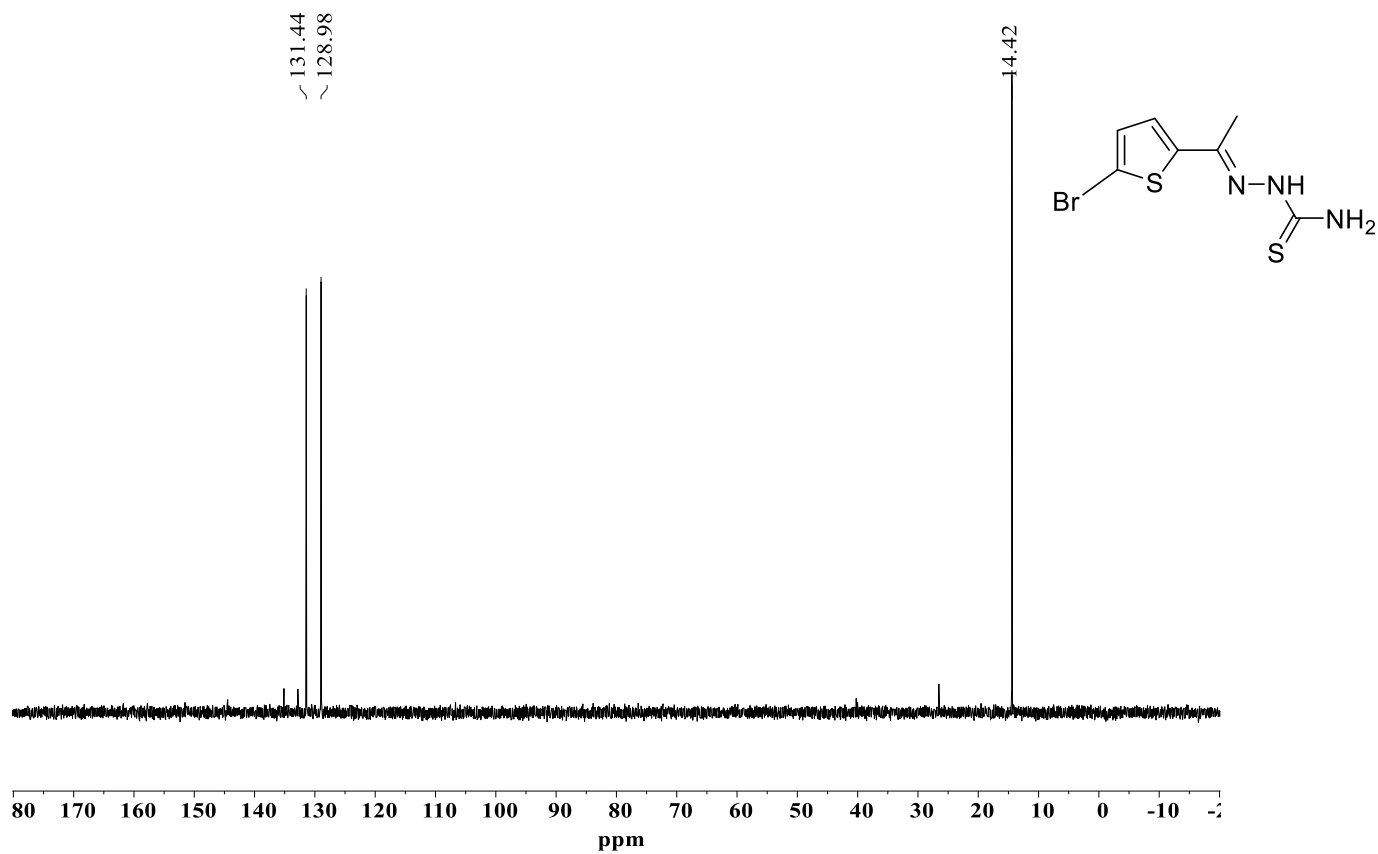


FIGURA A64 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante BRT em  $\text{DMSO} - d^6$ .

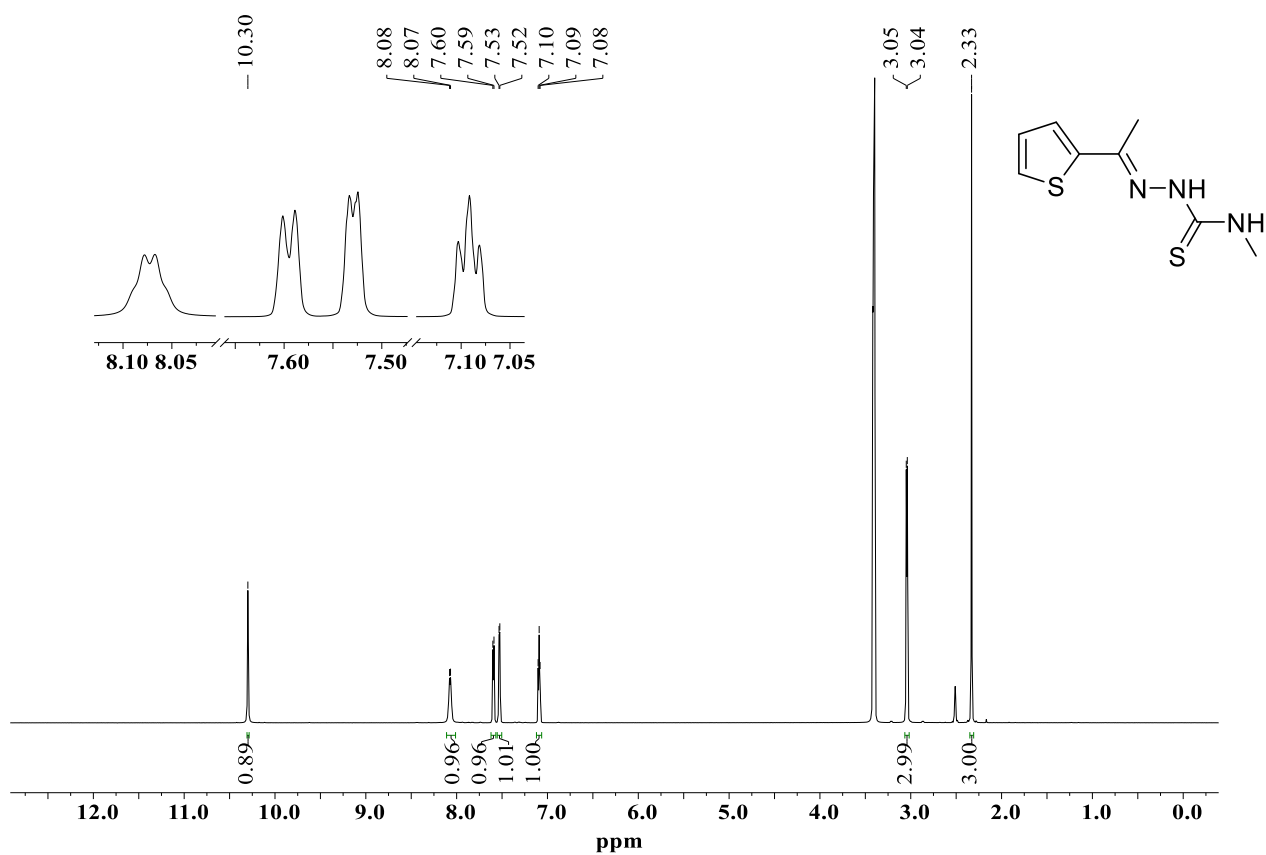


FIGURA A65 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante TMT em DMSO –  $d^6$ .

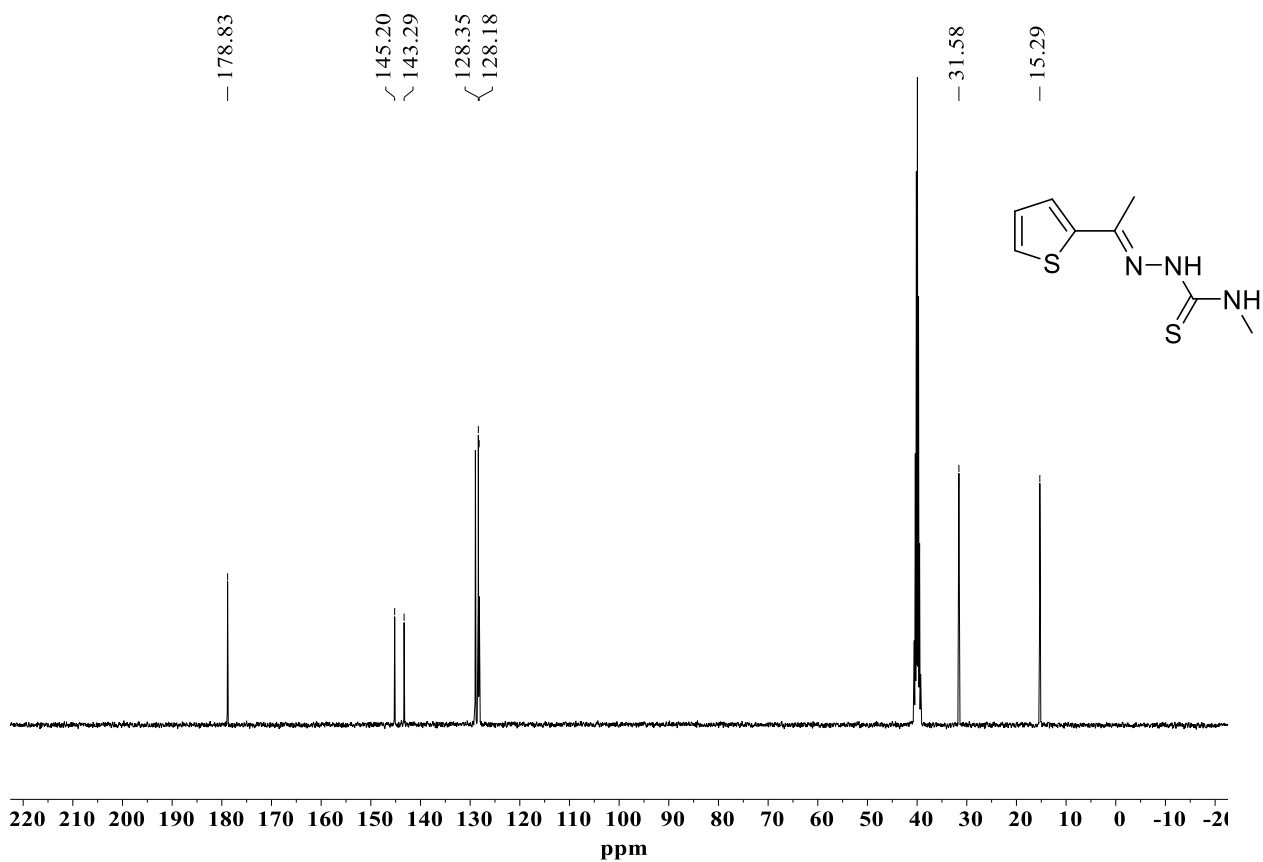


FIGURA A66 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante TMT em DMSO –  $d^6$ .



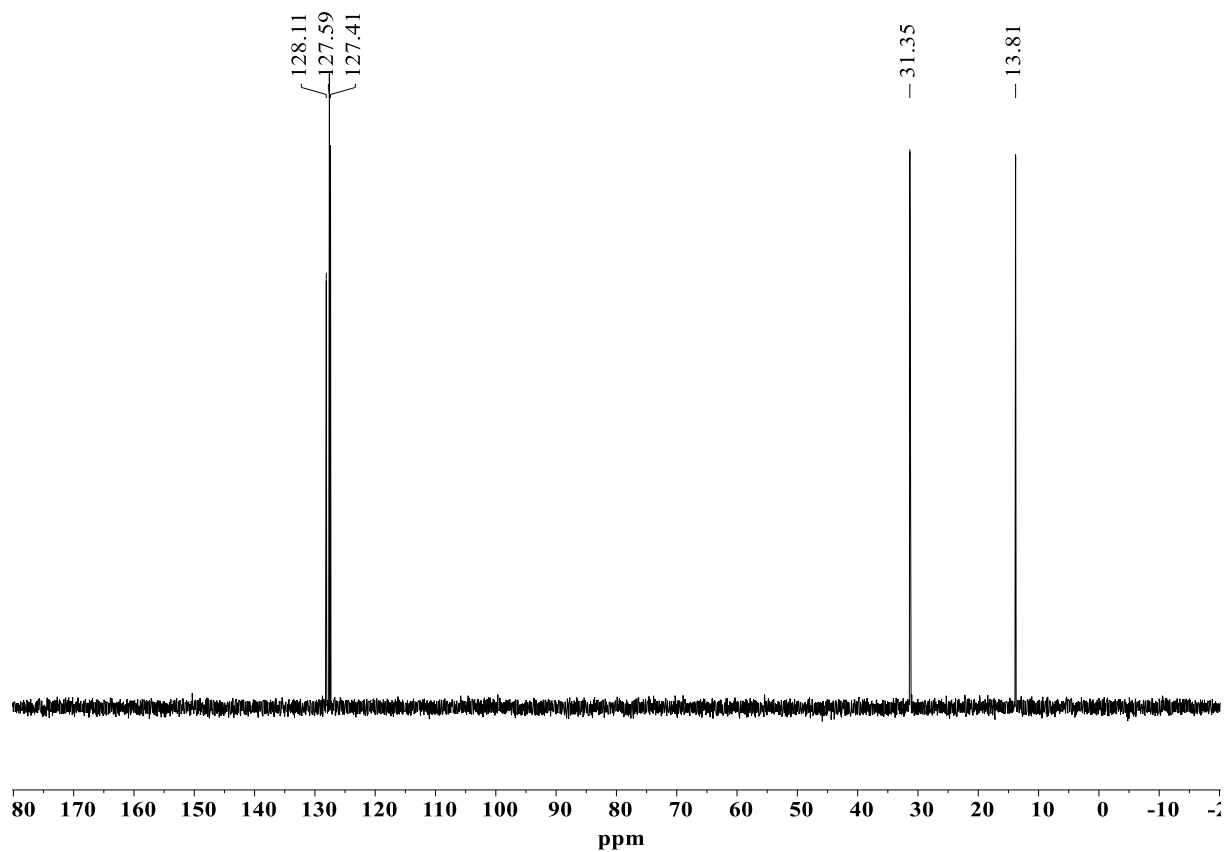


FIGURA A67 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante TMT em CDCl<sub>3</sub>.

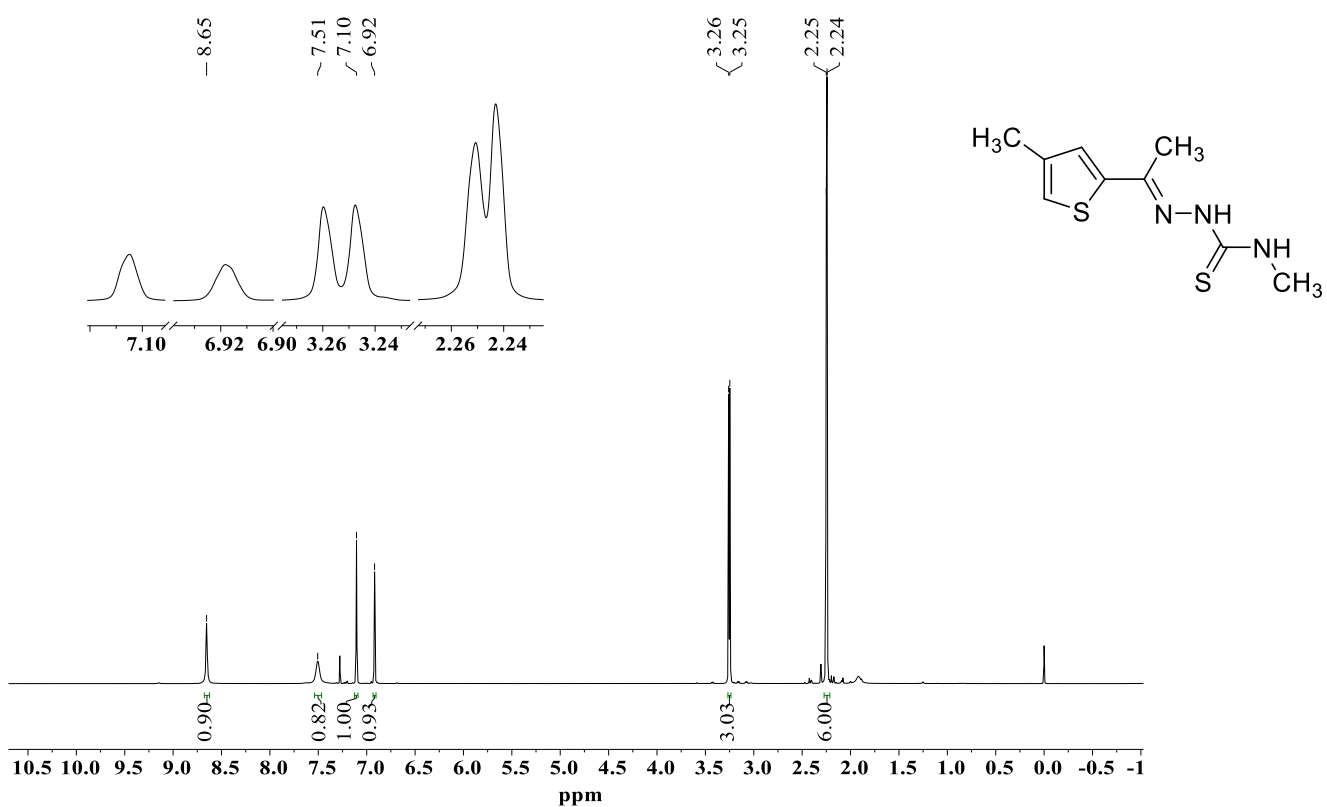


FIGURA A68 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do ligante MMT em CDCl<sub>3</sub>.

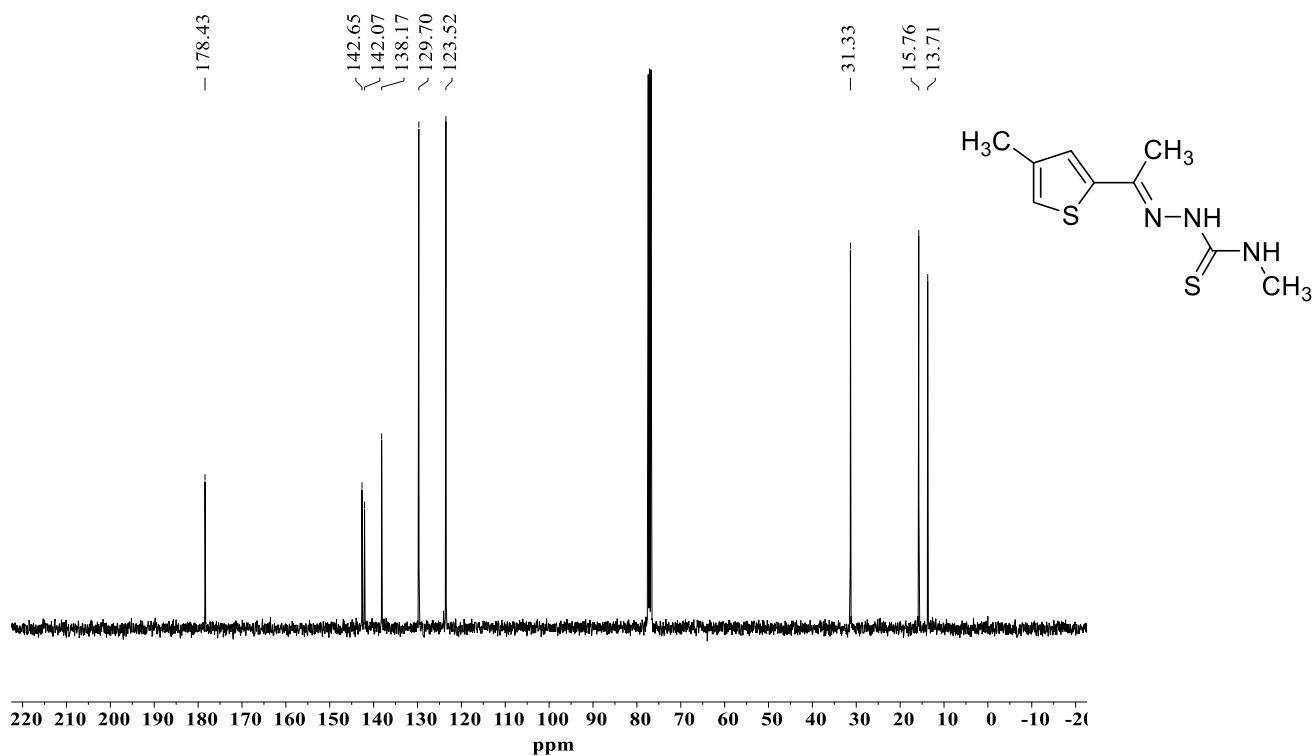


FIGURA A69 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante MMT em  $\text{CDCl}_3$ .

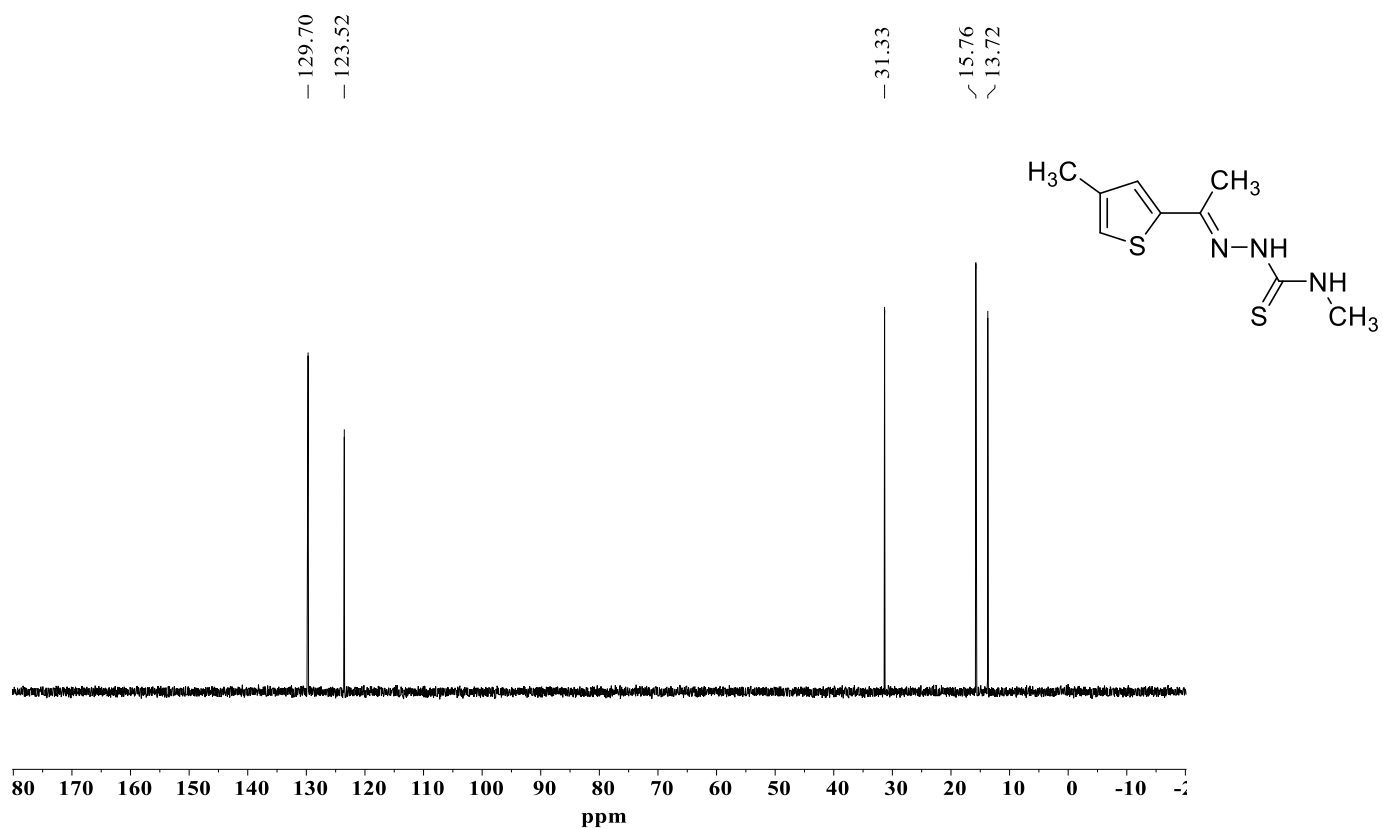


FIGURA A70 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante MMT em  $\text{CDCl}_3$ .

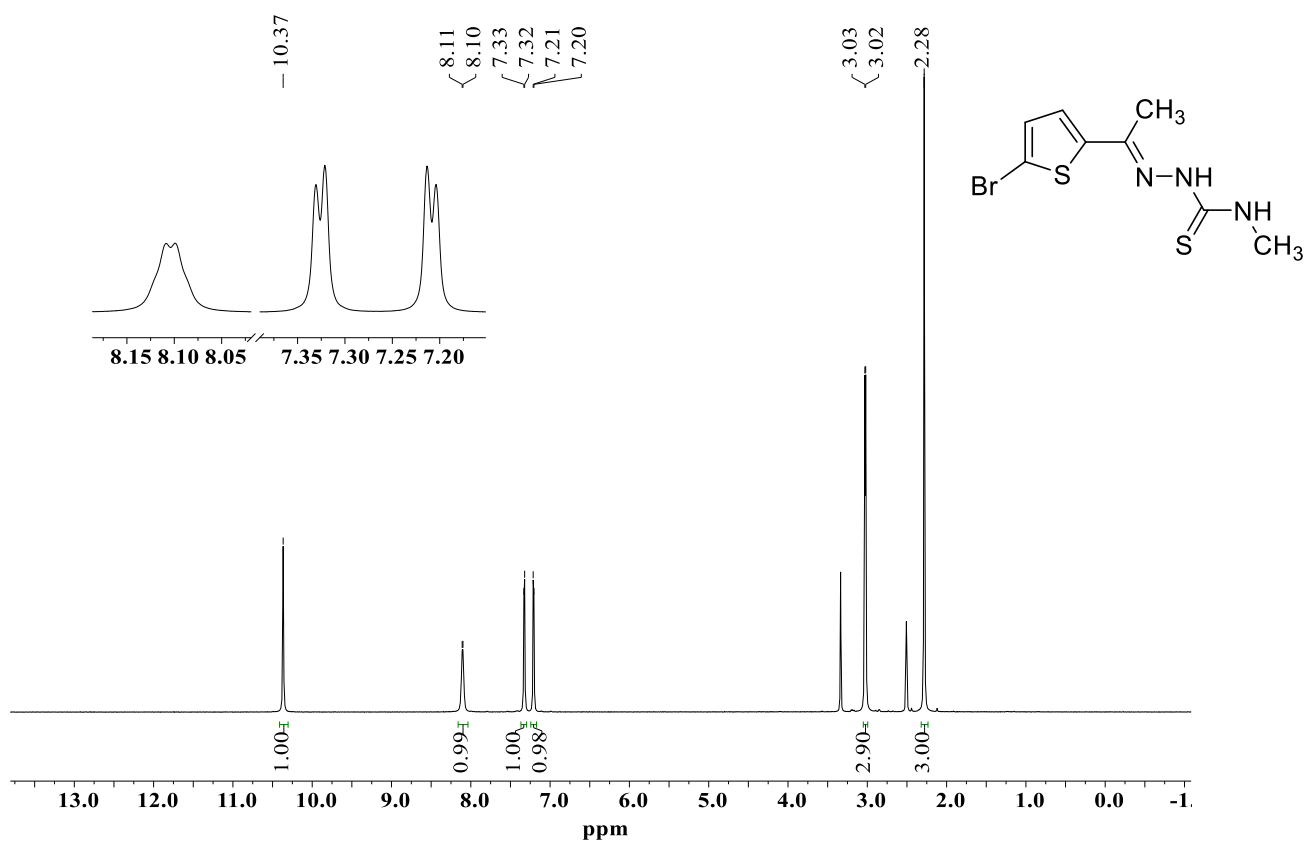


FIGURA A71 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante BRMT em DMSO -  $d_6$ .

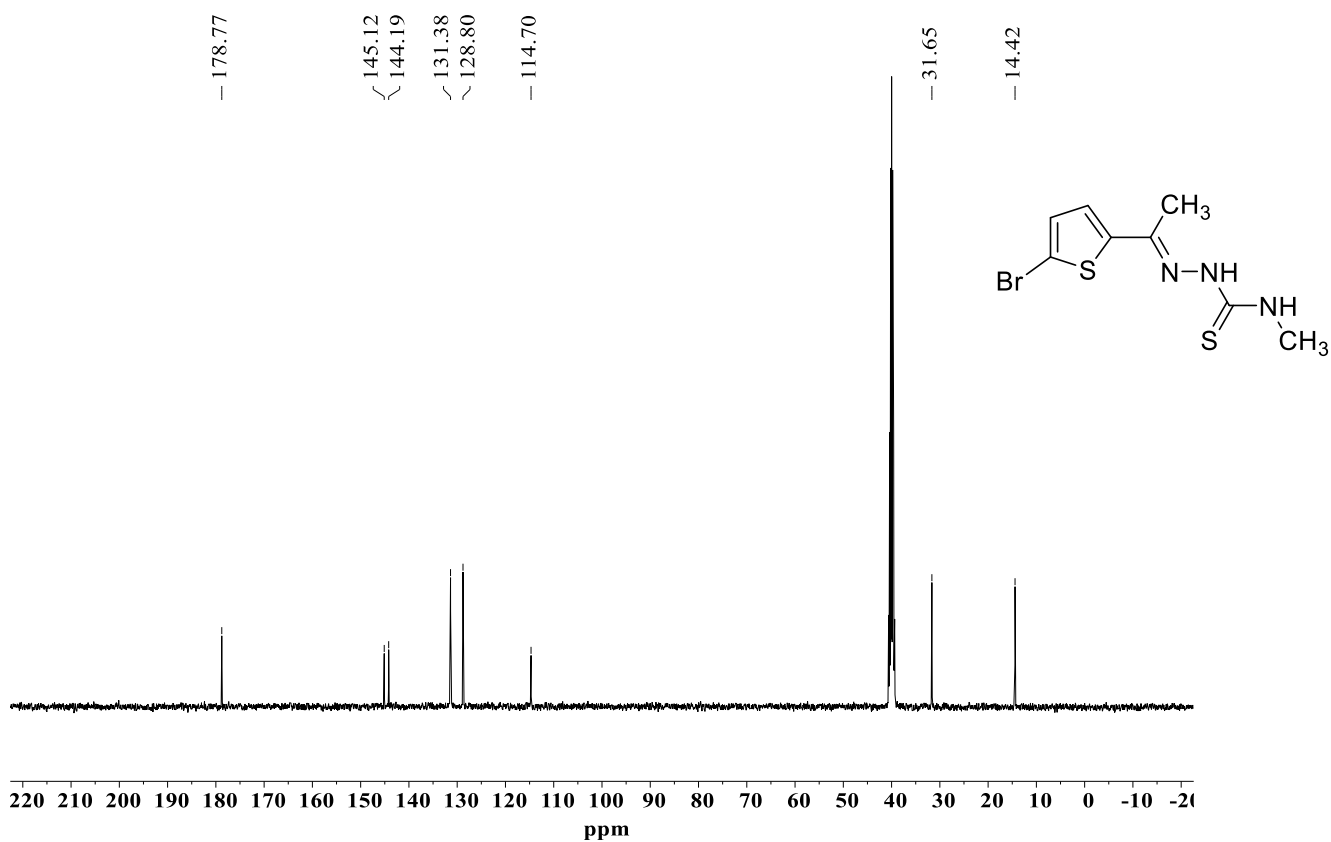


FIGURA A72 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante BRMT em DMSO -  $d_6$ .

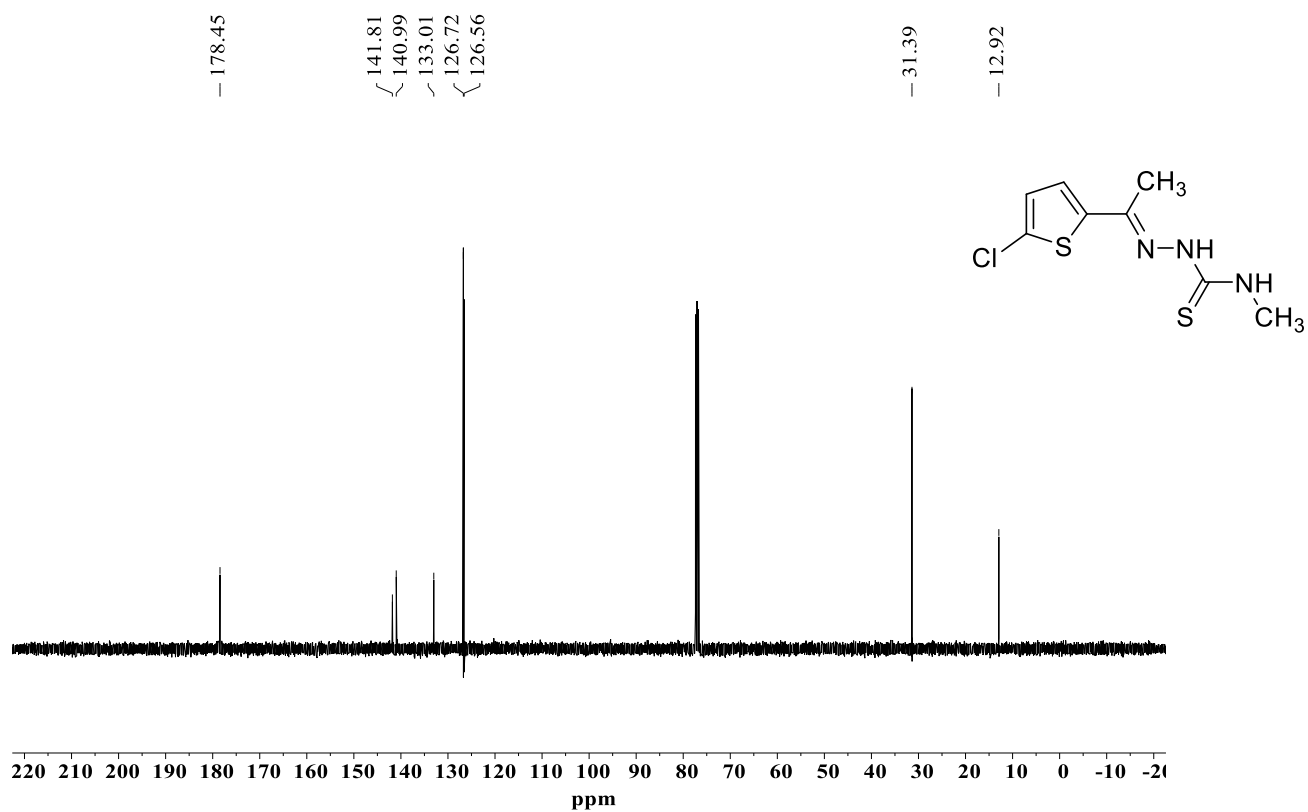


FIGURA A73 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ligante CLMT em  $\text{CDCl}_3$ .

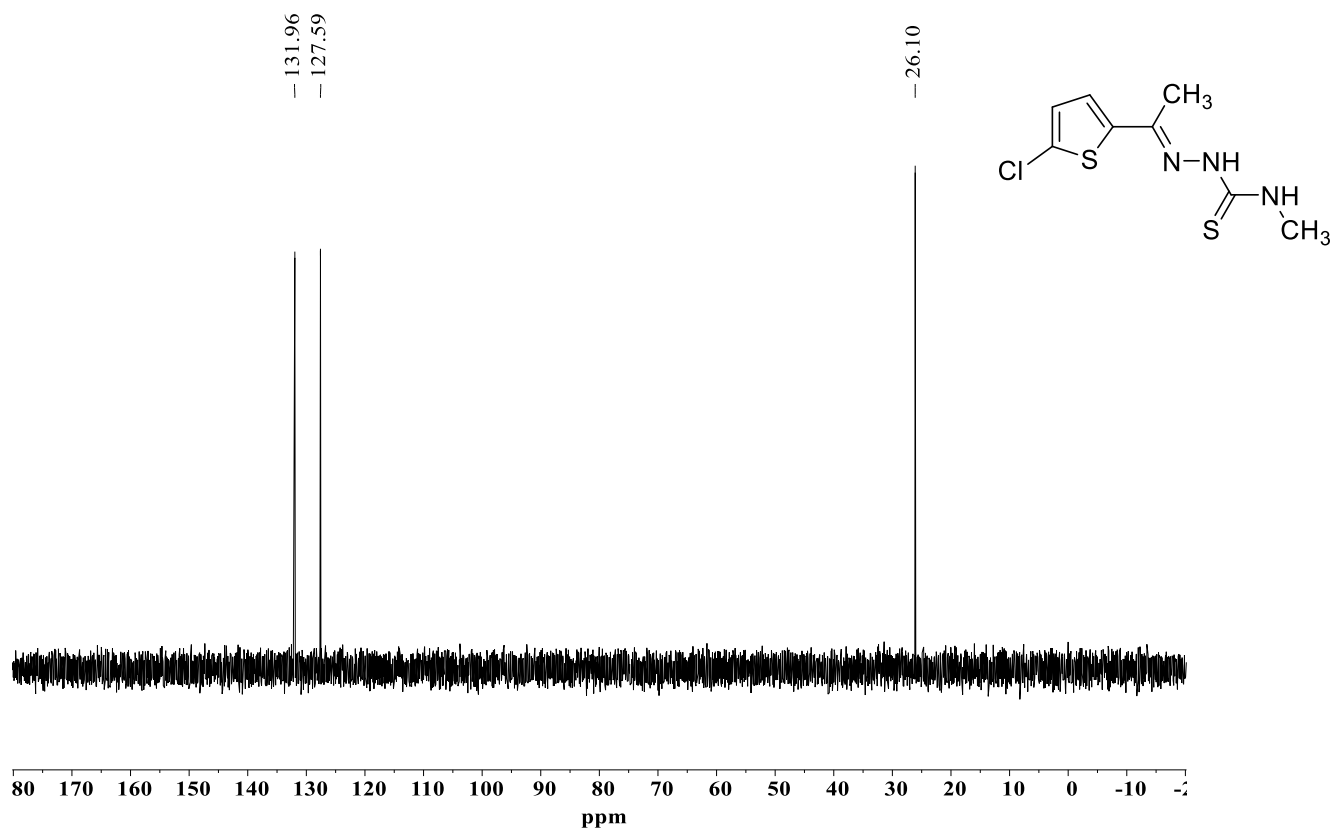


FIGURA A74 - Espectro de RMN DEPT-135 do ligante CLMT em  $\text{CDCl}_3$ .

## 7.5 – Difração de Raios X

TABELA A2 - Dados resultantes da técnica de Difração de Raios X.

Compostos	CLET	PdCH <sub>3</sub> .NH	PdBr.NH <sub>2</sub>	PdCH <sub>3</sub>	PdCl <sub>3</sub>	PdCH <sub>3</sub> .DMSO	PdBr
Fórmula empírica	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> ClN <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> BrClN <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>3</sub> PPdS <sub>2</sub> · 0.5(CH <sub>3</sub> S)·C <sub>1.5</sub> H <sub>4.5</sub> OS <sub>0.5</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> BrClN <sub>3</sub> P PdS <sub>2</sub>
Peso molecular	261.79	630.45	681.30	644.48	687.33	722.67	708.35
Temperatura	293	293	293	293	293	293	293
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> <sub>1</sub>	<i>P</i> <sub>1</sub>	<i>P</i> <sub>1</sub>	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub> / <i>n</i>	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub> / <i>n</i>
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	7.6153 (3), 14.7333 (4), 11.0431 (4)	9.6647 (5), 11.6600 (6), 12.2470 (6)	9.4232 (5), 10.3959 (5), 15.0550 (7)	8.8487 (4), 10.4126 (5), 15.8911 (7)	12.2055 (6), 11.4184 (7), 20.9996 (12)	10.9133 (4), 21.4857 (9), 13.8175 (7)	14.2389 (4), 11.2379 (3), 19.0398 (5)
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	$\beta$ (°) 104.997 (4)	94.563 (4), 95.839 (4), 101.702 (4)	84.286 (4), 78.050 (4), 64.351 (5)	83.812 (4), 82.006 (4), 75.726 (4)	$\beta$ (°) 99.165 (6)	$\beta$ (°) 91.866 (4)	$\beta$ (°) 111.601 (3)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	11.9682 (8)	1337.29 (12)	1300.61 (12)	1401.06 (11)	2889.3 (3)	3238.2 (2)	2832.69 (14)
<i>Z</i>	4	2	2	2	4	4	4
<i>F</i> (000)	544	-	676	656	1384	1478.972	1412
Tipo de radiação	Mo <i>K</i> $\alpha$	Mo <i>K</i> $\alpha$	Mo <i>K</i> $\alpha$	Mo <i>K</i> $\alpha$	Mo <i>K</i> $\alpha$	Mo <i>K</i> $\alpha$	Mo <i>K</i> $\alpha$
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.64	1.03	2.59	0.99	1.14	0.93	2.39
Tamanho do cristal	0.70 x 0.54 x 0.22	-	-	0.39 × 0.13 × 0.06	0.55 × 0.42 × 0.11	0.52 × 0.34 × 0.31	-
Difratometro	Rigaku Saturn724+ (2x2 bin mode)	XtaLAB Mini (ROW)	XtaLAB Mini (ROW)	XtaLAB Mini (ROW)	XtaLAB Mini (ROW)	XtaLAB Mini (ROW)	XtaLAB Mini (ROW)

TABELA A3 - Informações complementares provenientes da técnica de Difração de Raios X.

Compostos	CLET	PdCH <sub>3</sub> .NH	PdBr.NH <sub>2</sub>	PdCH <sub>3</sub>	PdCl <sub>3</sub>	PdCH <sub>3</sub> .DMSO	PdBr
Correção de absorção	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.39.35c (Rigaku Oxford Diffraction, 2017) SCALE3 ABSPACK.	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.39.35c (Rigaku Oxford Diffraction, 2017) algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK.	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.39.35c (Rigaku Oxford Diffraction, 2017) algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK.	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.39.35c (Rigaku Oxford Diffraction, 2017) algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK.	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.39.35c (Rigaku Oxford Diffraction, 2017) algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK.	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.41.93a (Rigaku Oxford Diffraction, 2017) algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK.	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.39.35c (Rigaku Oxford Diffraction, 2017) algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK.
Tmin, Tmax	0.865,1.000	0.963, 1.000	0.788, 1.000	0.993,1.000	0.649, 1.000	0.841, 1.000	0.753, 1.000
Nº de medidas, independentes e reflexões observadas [ $I > 2\sigma(I)$ ]	20718, 2633, 2346	14562, 5816, 4957	19504, 5687, 4831	19941, 6191, 5216	17522, 6315, 4687	103095, 7063, 6101	61158, 6191, 5075
R <sub>int</sub>	0.025	0.018	0.028	0.036	0.037	0.045	0.032
( $\sin \theta/\lambda$ ) <sub>max</sub> (Å <sup>-1</sup> )	0.641	0.639	0.639	0.641	0.639	0.639	0.639
Índices de indexação	h = -9 → 9, k = -18 → 18, l = -14 → 14	h = -12 → 12, k = -14 → 14, l = -15 → 15	h = -12 → 12, k = -13 → 13, l = -19 → 19	h = -11 → 11, k = -13 → 13, l = -20 → 20	h = -15 → 15, k = -12 → 14, l = -25 → 26	h = -17 → 16, k = -34 → 33, l = -21 → 22	h = -18 → 18, k = -14 → 14, l = -24 → 24
R[F <sup>2</sup> > 2σ(F <sup>2</sup> )], wR(F <sup>2</sup> ), S	0.035, 0.092, 1.09	0.036, 0.095, 1.12	0.026, 0.064, 1.04	0.032, 0.072, 1.06	0.044, 0.117, 1.16	0.036, 0.094, 1.21	0.044, 0.108, 1.09
Nº de reflexões	2633	5816	5687	6191	6315	7063	6191
Nº de parâmetros	138	349	308	328	327	395	336
Nº de restrições	-	144	-	-	0	30	4
Tratamento átomo-H	Parâmetros de átomo H restritos	Parâmetros de átomo H restritos	Parâmetros de átomo H restritos	Parâmetros de átomo H restritos	Parâmetros de átomo H restritos	Parâmetros de átomo H restritos	Parâmetros de átomo H restritos
Δρ <sub>max</sub> , Δρ <sub>min</sub> (e Å <sup>-3</sup> )	0.25, -0.37	0.83, -0.69	0.57, -0.67	0.47, -0.38	0.93, -1.30	0.72, -0.49	1.50, -1.23

## 7.6 – Estudo de Estabilidade em DMSO: RMN

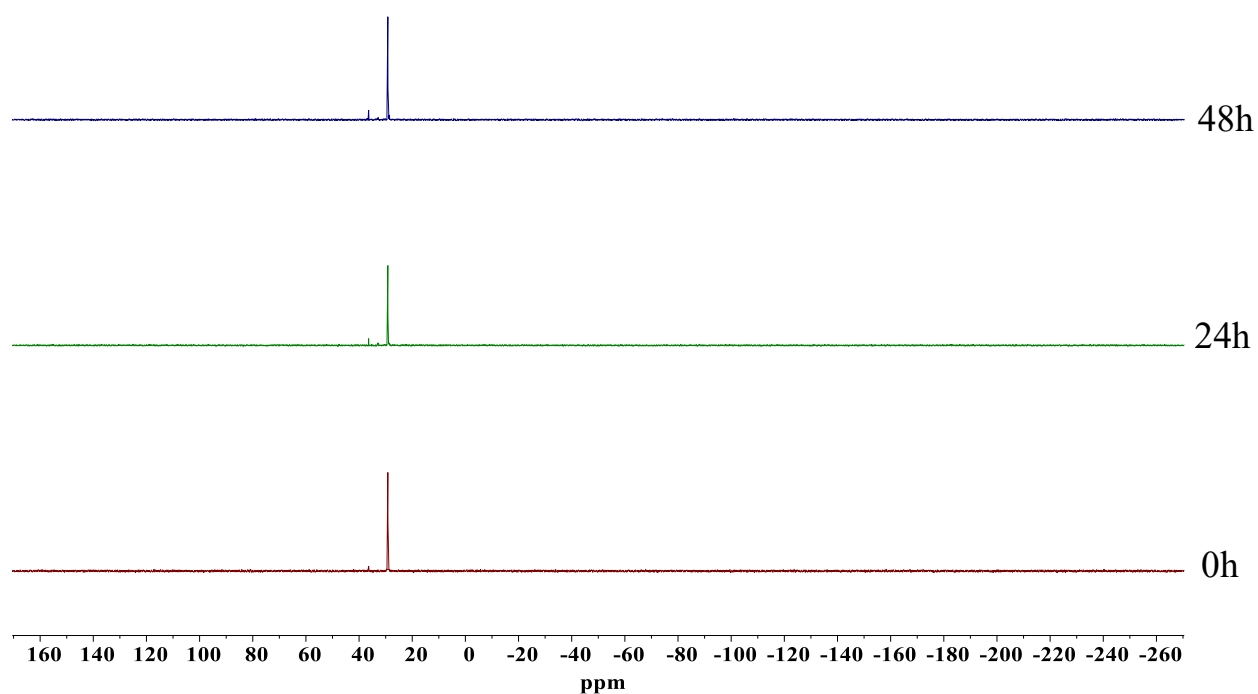


FIGURA A75 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PdT em DMSO- $\text{D}_2\text{O}$ /DMEM nos tempos de 0,24 e 48h.

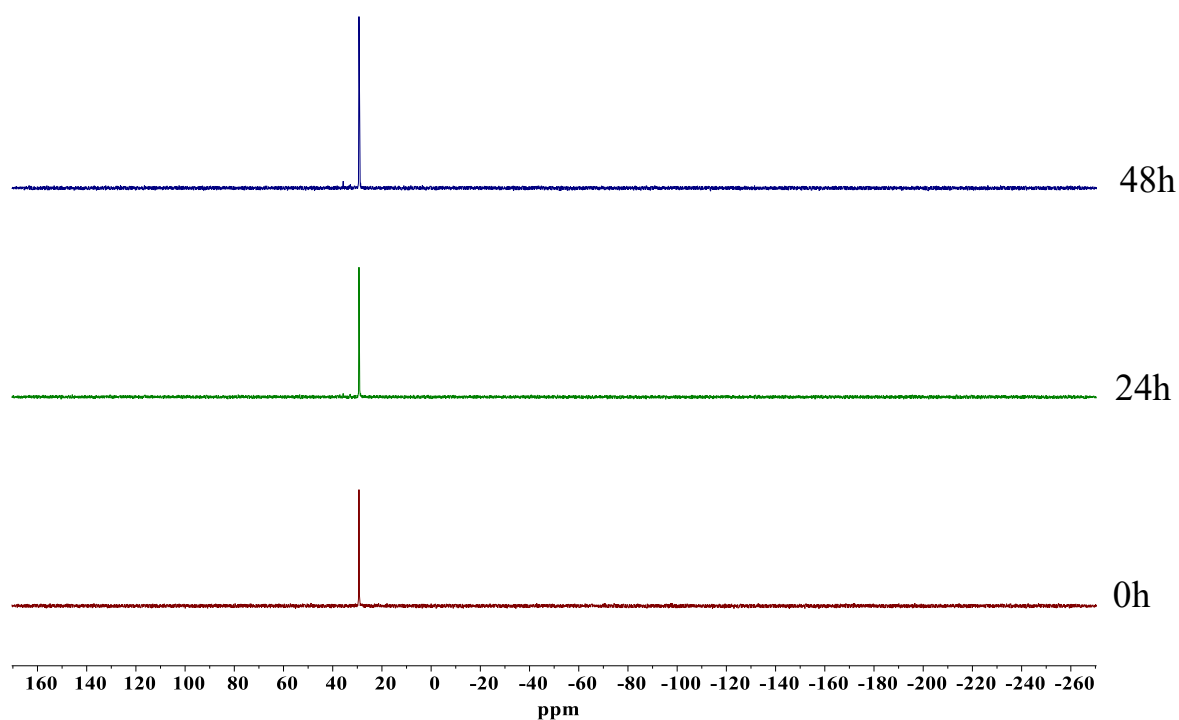


FIGURA A76 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PdCl em DMSO- $\text{D}_2\text{O}$ /DMEM nos tempos de 0,24 e 48h.

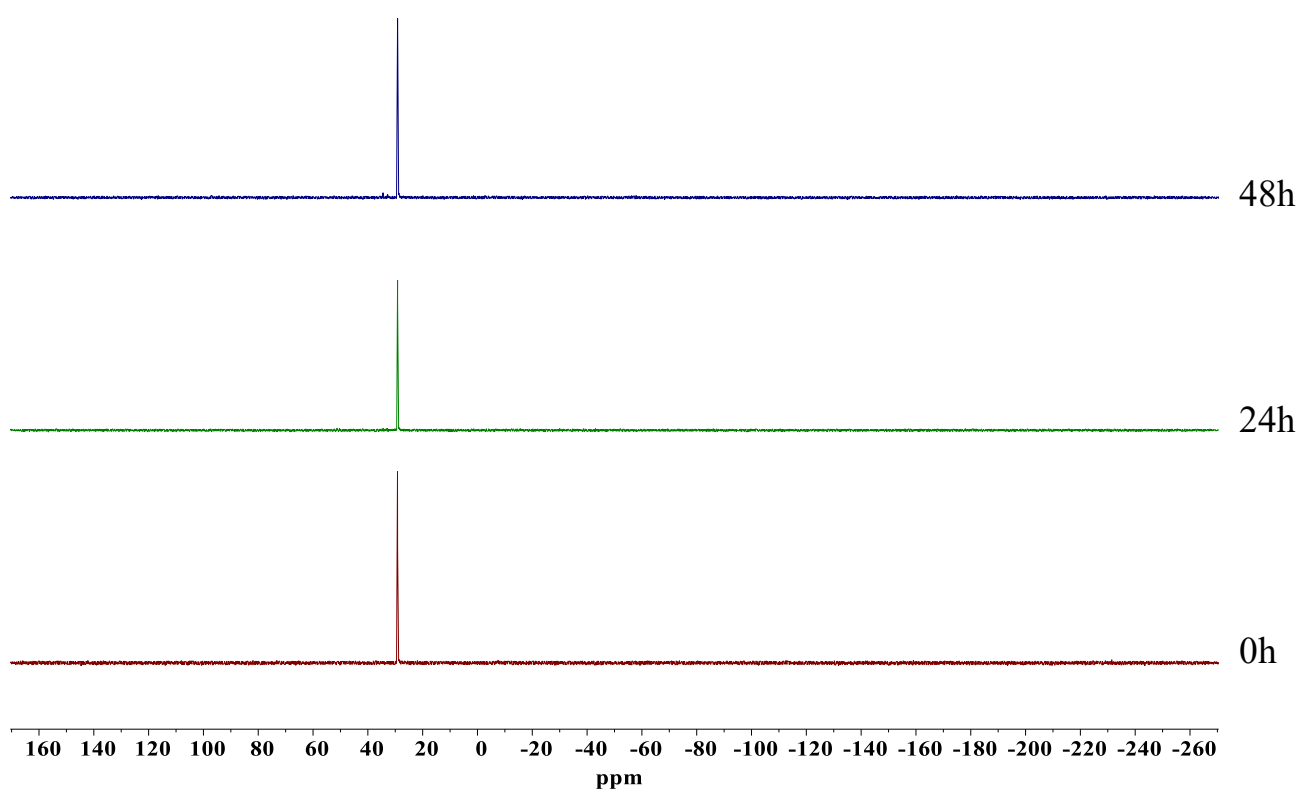


FIGURA A77 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo  $\text{PdCH}_3$  em  $\text{DMSO-D}_2\text{O/DMEM}$  nos tempos de 0,24 e 48h.

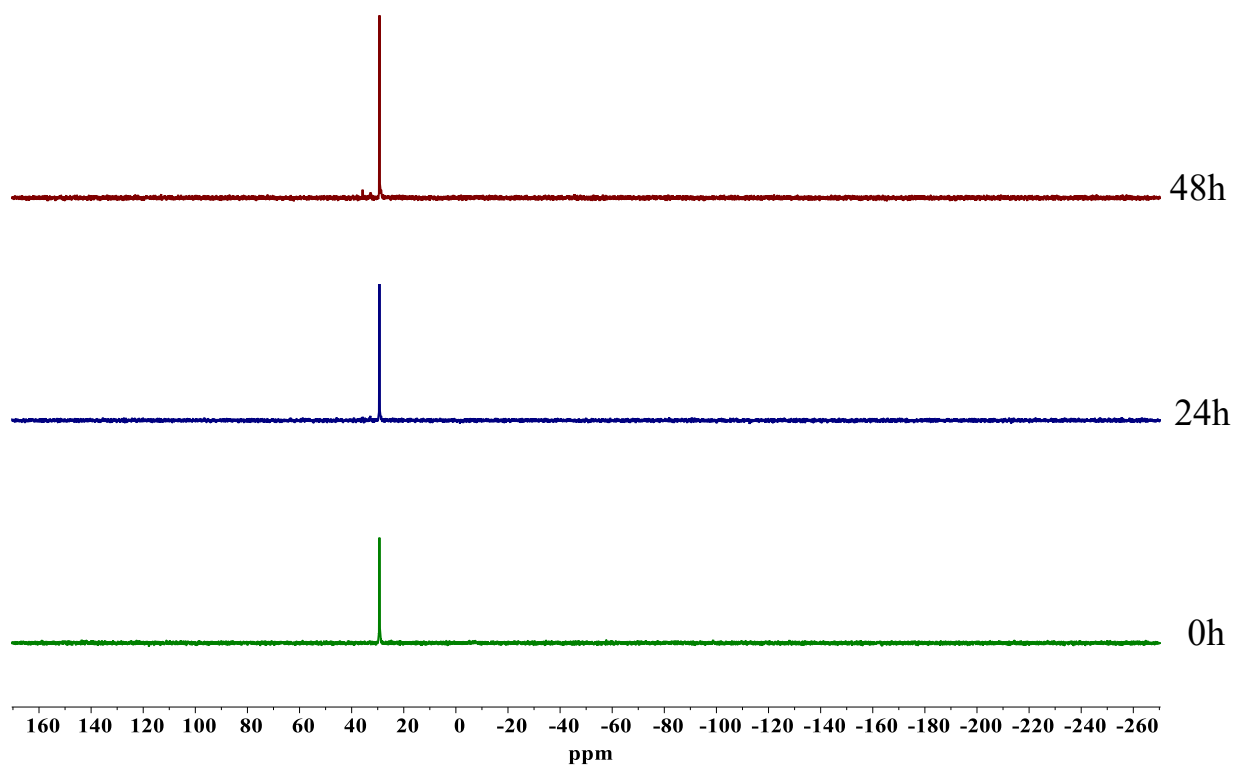


FIGURA A78 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo  $\text{PdBr}$  em  $\text{DMSO-D}_2\text{O/DMEM}$  nos tempos de 0,24 e 48h.



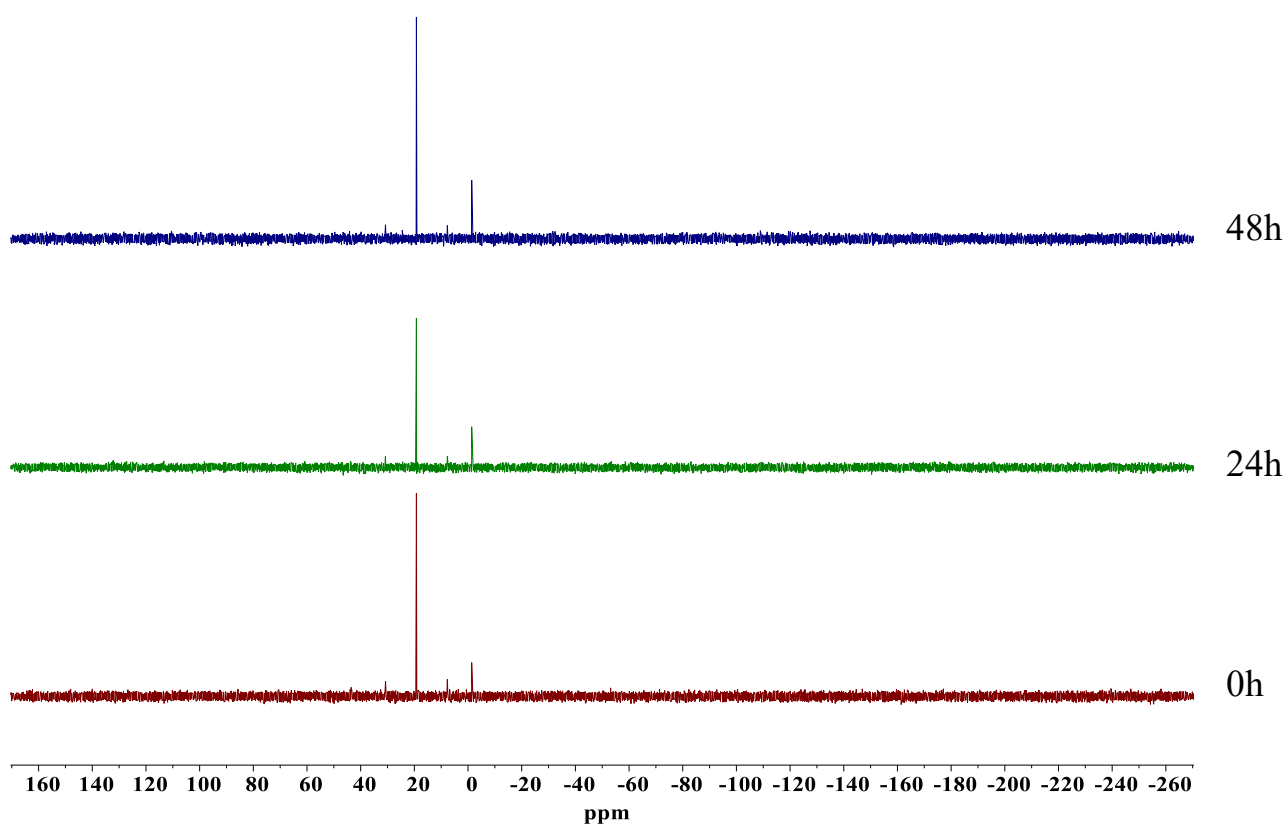


FIGURA A79 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PtT em DMSO- $\text{D}_2\text{O}$ /DMEM nos tempos de 0,24 e 48h.

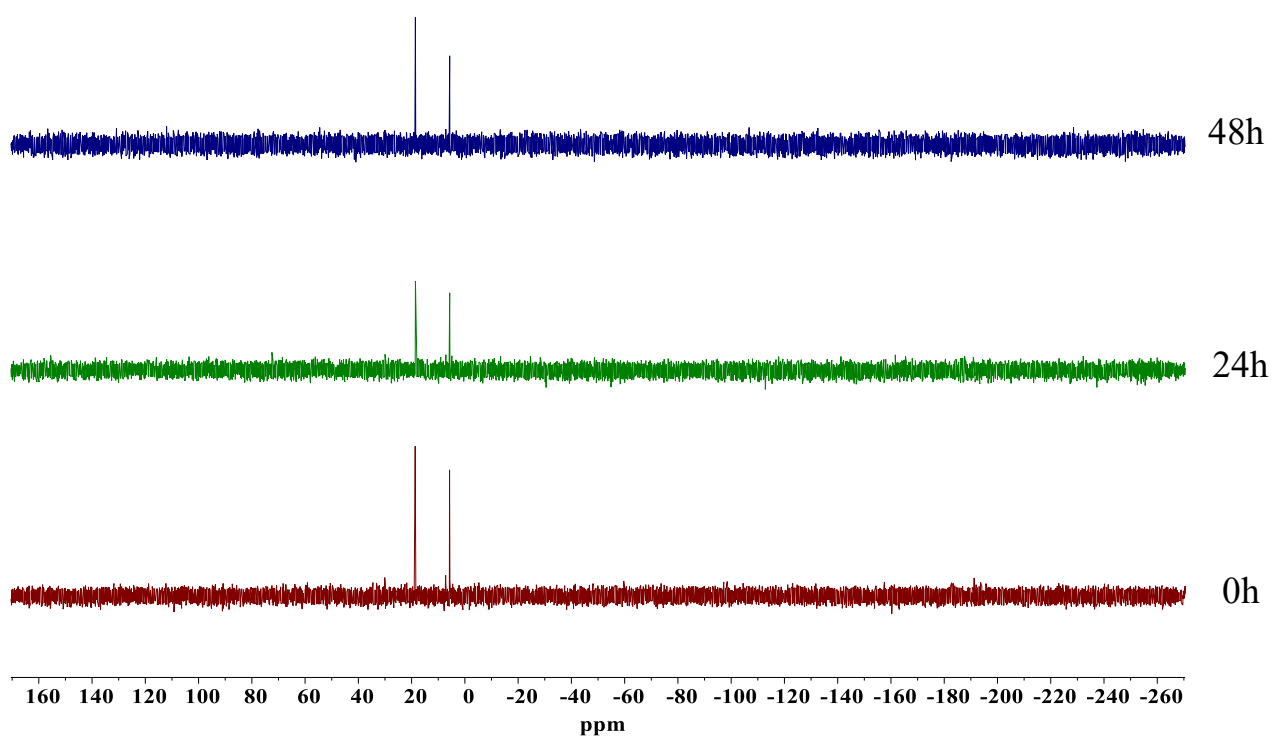


FIGURA A80 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo PtBr em DMSO- $\text{D}_2\text{O}$ /DMEM nos tempos de 0,24 e 48h.

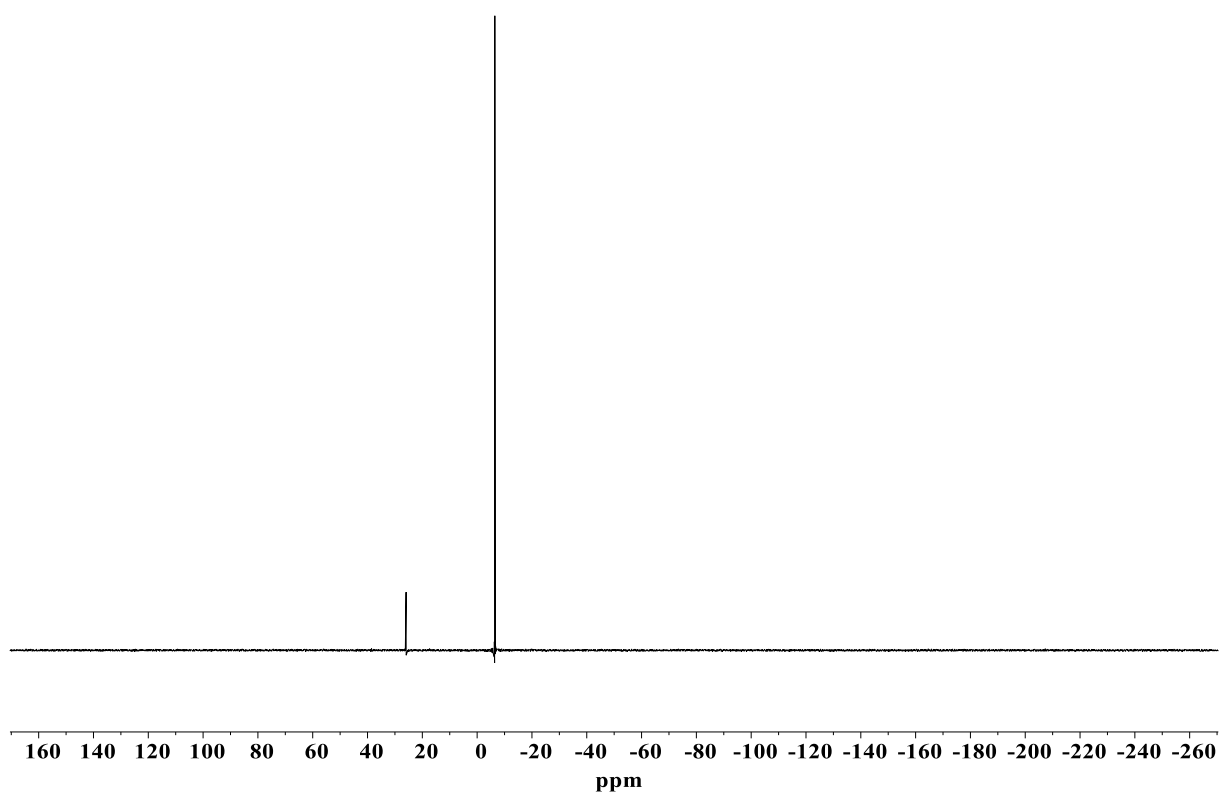


FIGURA A81 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  da trifenilfosfina em  $\text{DMSO-D}_2\text{O}$ .

### 7.6.1 – Estudo de Estabilidade em DMSO: UV-Vis

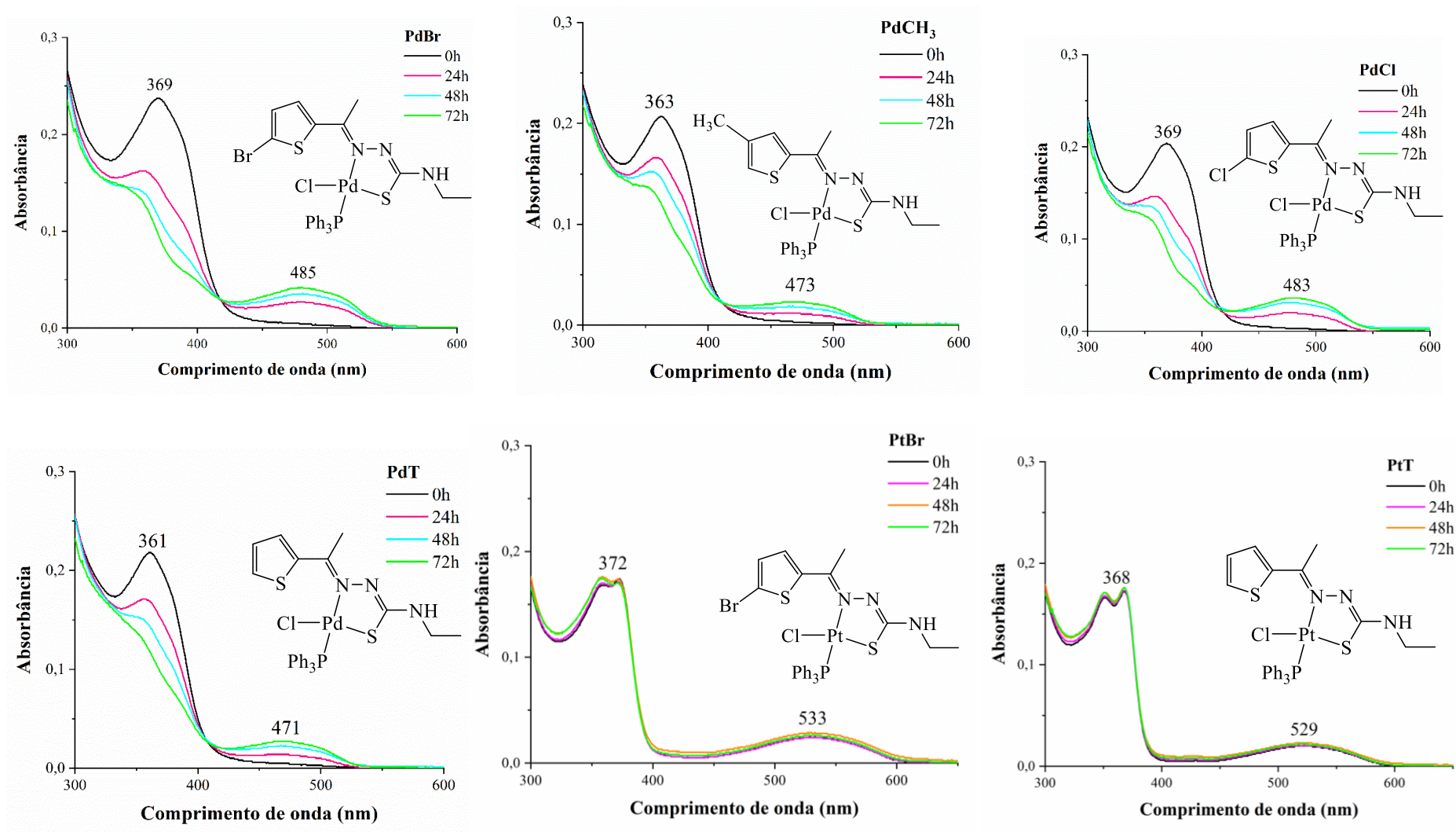


FIGURA A82 - Estabilidade dos complexos em DMSO no intervalo de tempo de 0 a 72h no UV-Vis.

## 7.6.2 – Estudo de Estabilidade em Acetona: UV-Vis

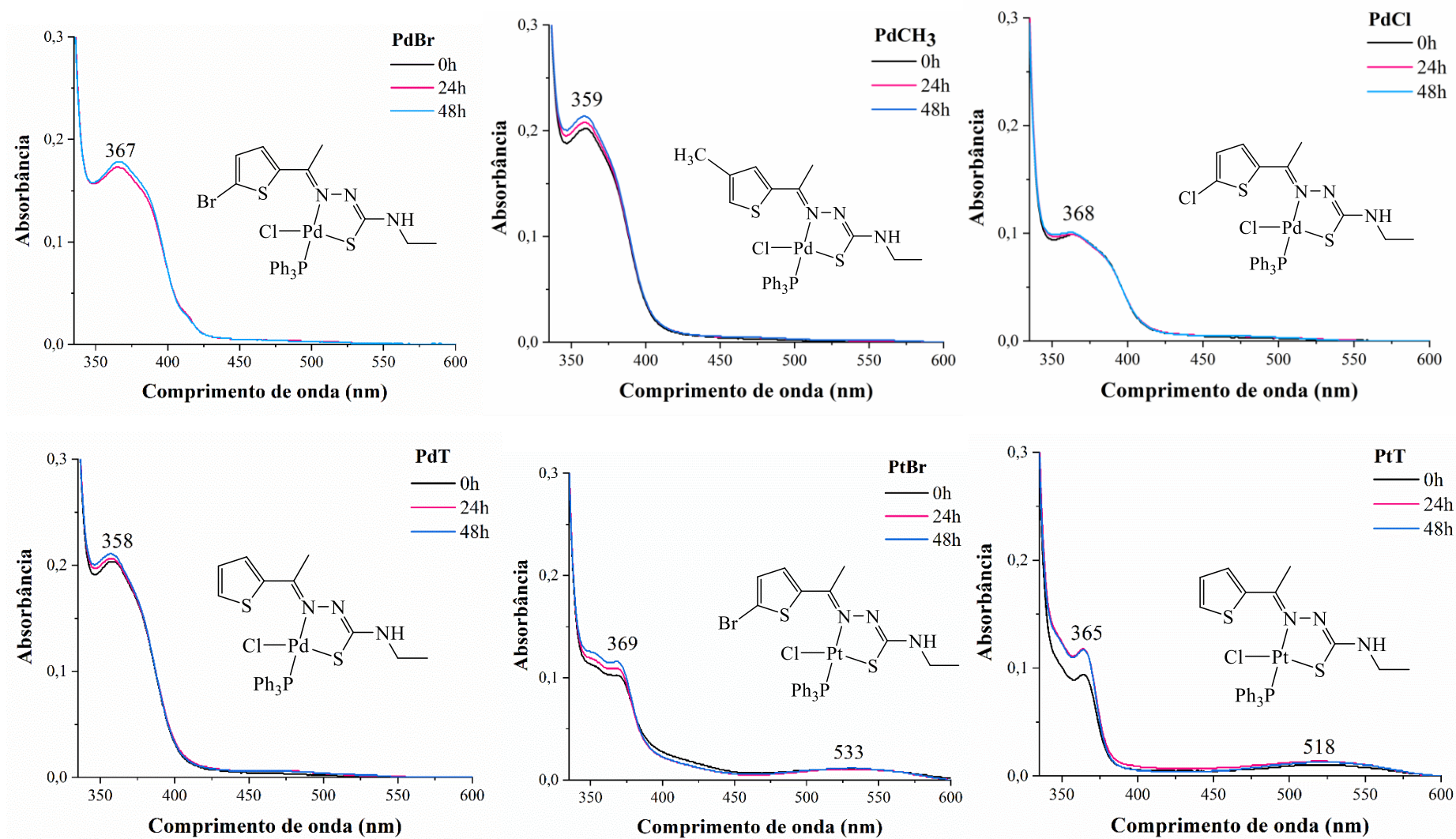


FIGURA A83 - Estabilidade dos complexos em acetona no intervalo de tempo de 0 a 48h no UV-Vis.

### 7.6.3 – Estudo de Estabilidade em DMSO sem luz: UV-Vis

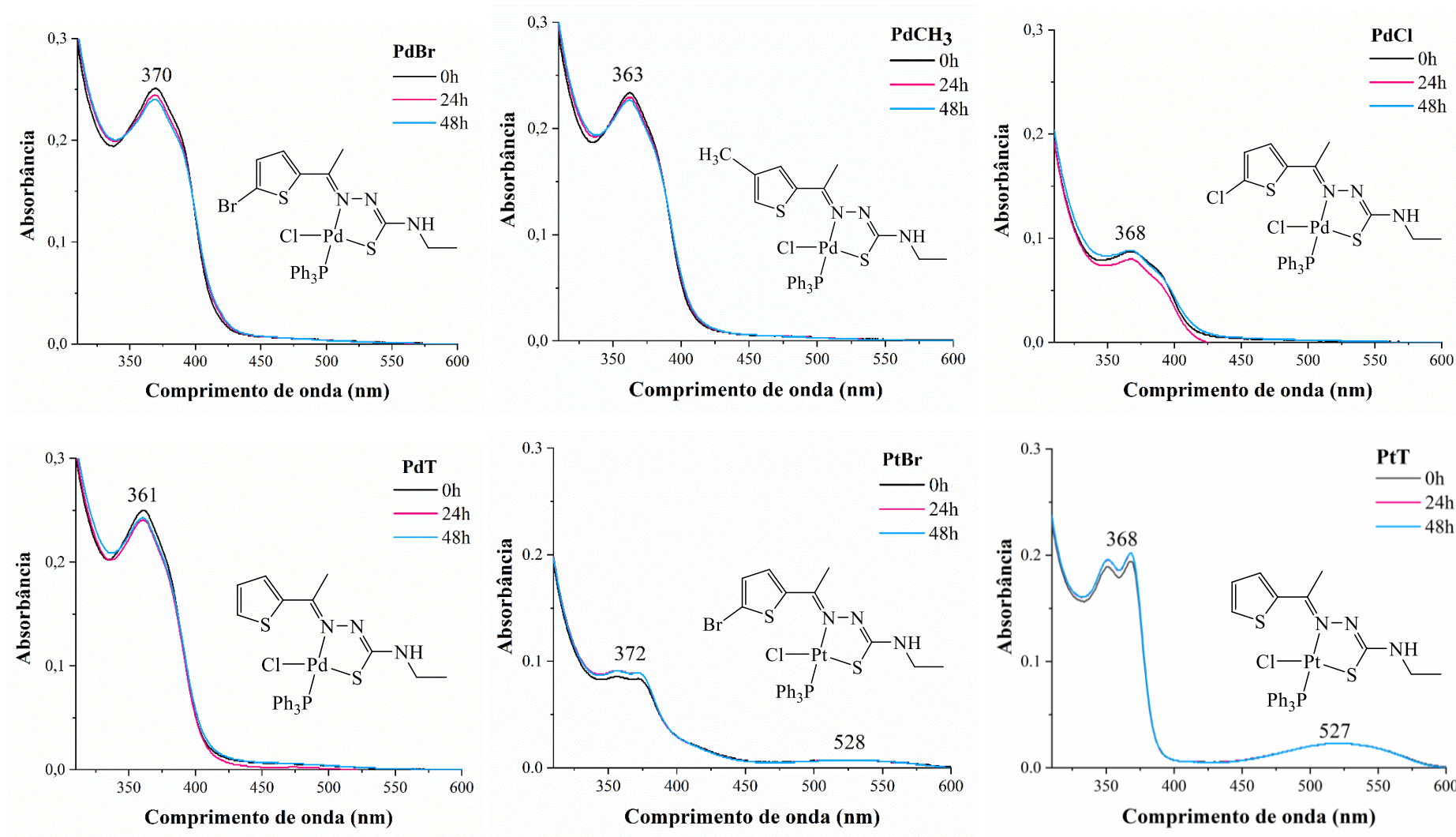


FIGURA A84 - Estabilidade dos complexos em DMSO sem luz em 0 a 48h no UV-Vis.

## 7.7 – Interação dos complexos com o ct-DNA: espectros obtidos por Titulação Espectroscópica (UV-Vis)

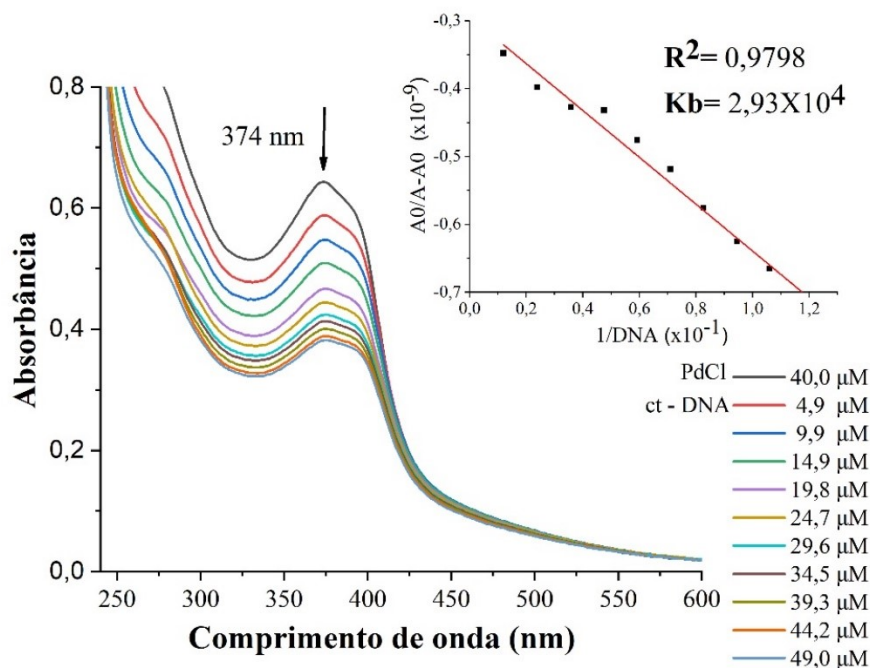


FIGURA A85 - Interação do complexo PdCl com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração do complexo PdCl se manteve fixa 40 μM e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,99 μM a 49,0 μM).

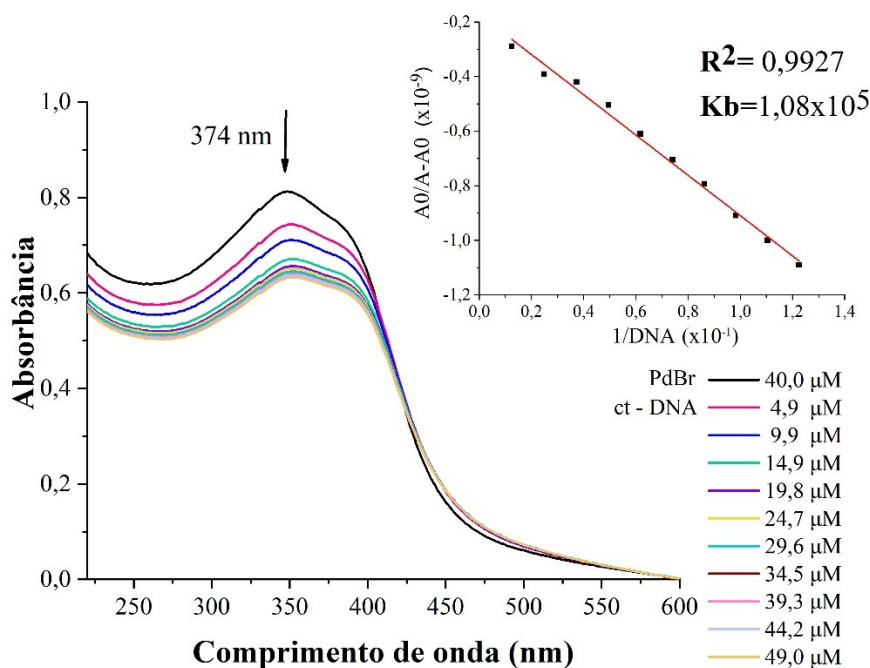


FIGURA A86 - Interação do complexo PdBr com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração do complexo PdBr se manteve fixa 40 μM e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,99 μM a 49,0 μM).

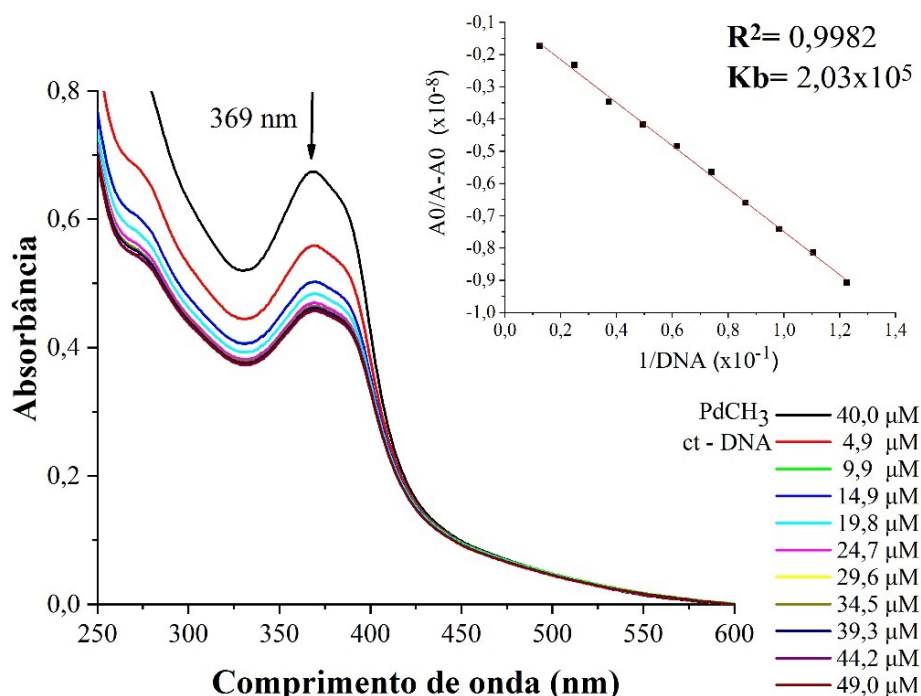


FIGURA A87 - Interação do complexo PdCH<sub>3</sub> com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração do complexo PdCH<sub>3</sub> se manteve fixa 40 μM e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,99 μM a 49,0 μM).

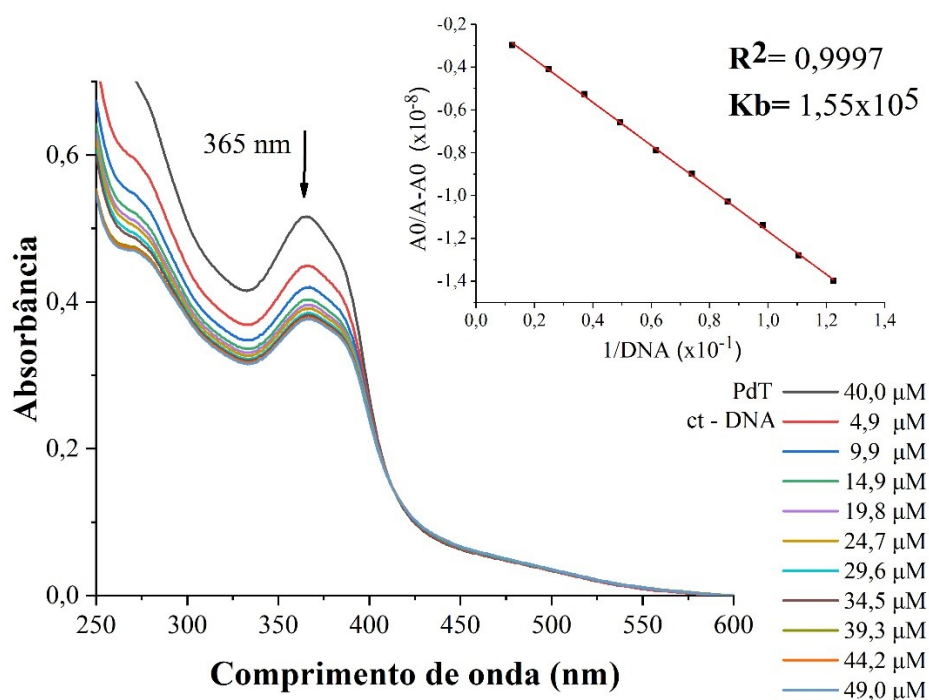


FIGURA A88 - Interação do complexo PdT com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração do complexo PdT se manteve fixa 40 μM e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,99 μM a 49,0 μM).

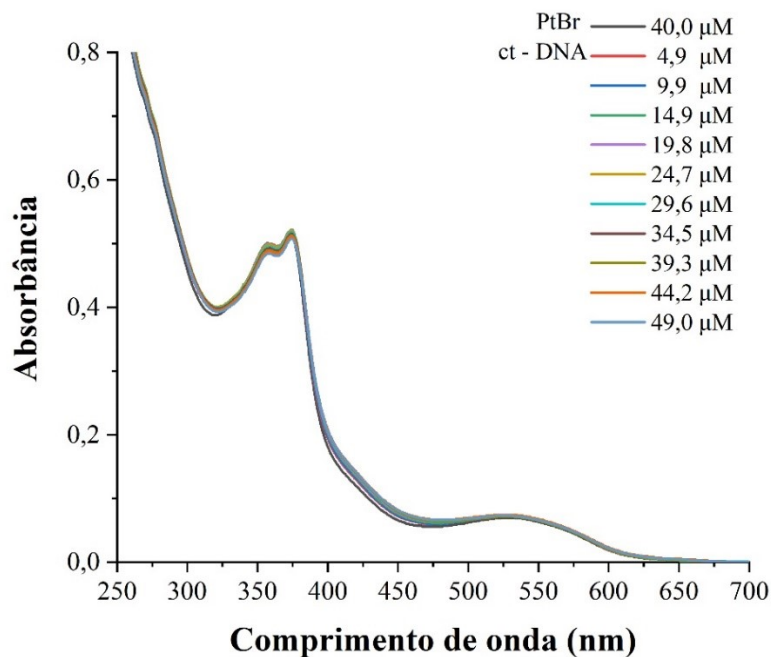


FIGURA A89 - Interação do complexo PtBr com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração do complexo PtBr se manteve fixa 40  $\mu\text{M}$  e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,99  $\mu\text{M}$  a 49,0  $\mu\text{M}$ ).

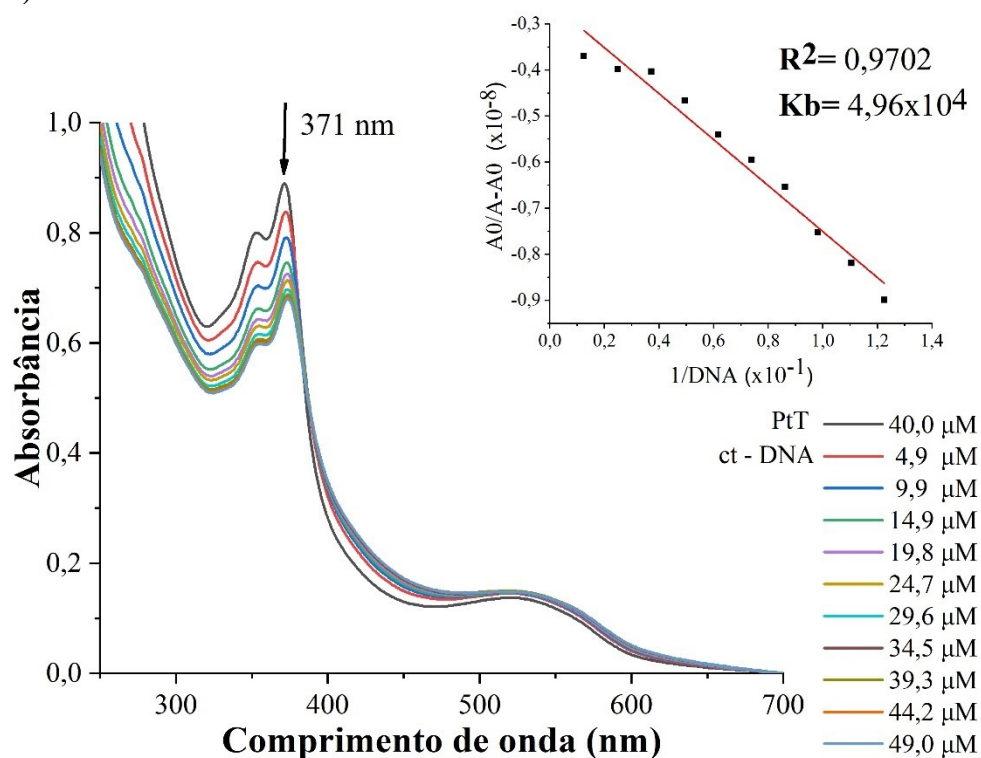


FIGURA A90 - Interação do complexo PtT com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível. A concentração do complexo PtT se manteve fixa 40  $\mu\text{M}$  e variou-se as concentrações do ct-DNA (4,99  $\mu\text{M}$  a 49,0  $\mu\text{M}$ ).



## 7.8 – Curva padrão obtida para os complexos pelo ensaio de Lipofilicidade N-octanol/H<sub>2</sub>O

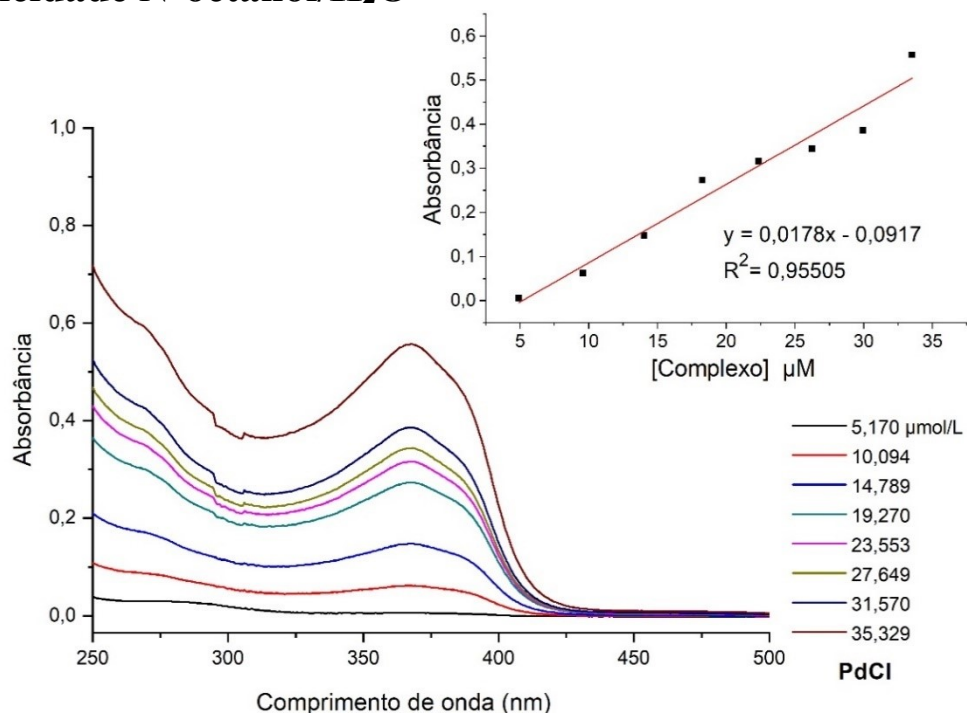


FIGURA A91 – Curva padrão proveniente do ensaio de lipofilicidade para o complexo PdCl.

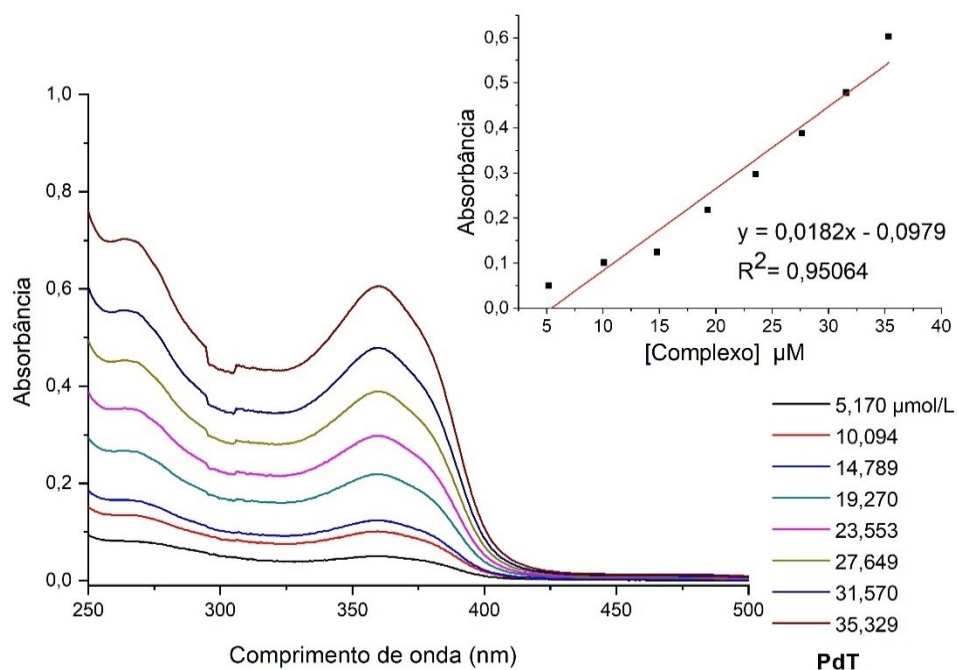


FIGURA A92 – Curva padrão proveniente do ensaio de lipofilicidade para o complexo PdT.

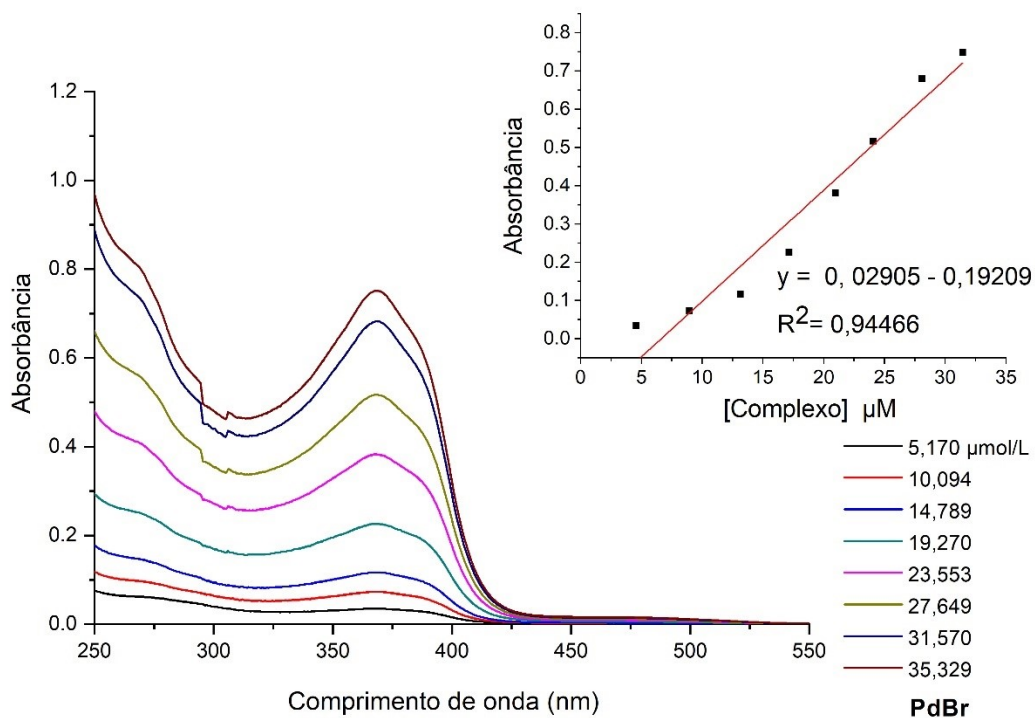


FIGURA A93 – Curva padrão proveniente do ensaio de lipofilicidade para o complexo PdBr.

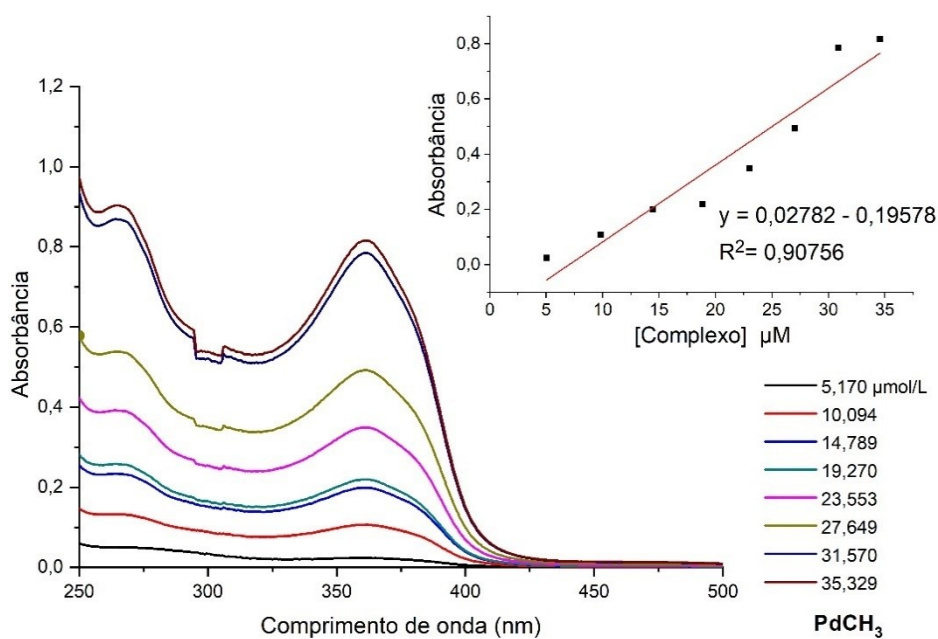


FIGURA A94 – Curva padrão proveniente do ensaio de lipofilicidade para o complexo PdCH<sub>3</sub>.

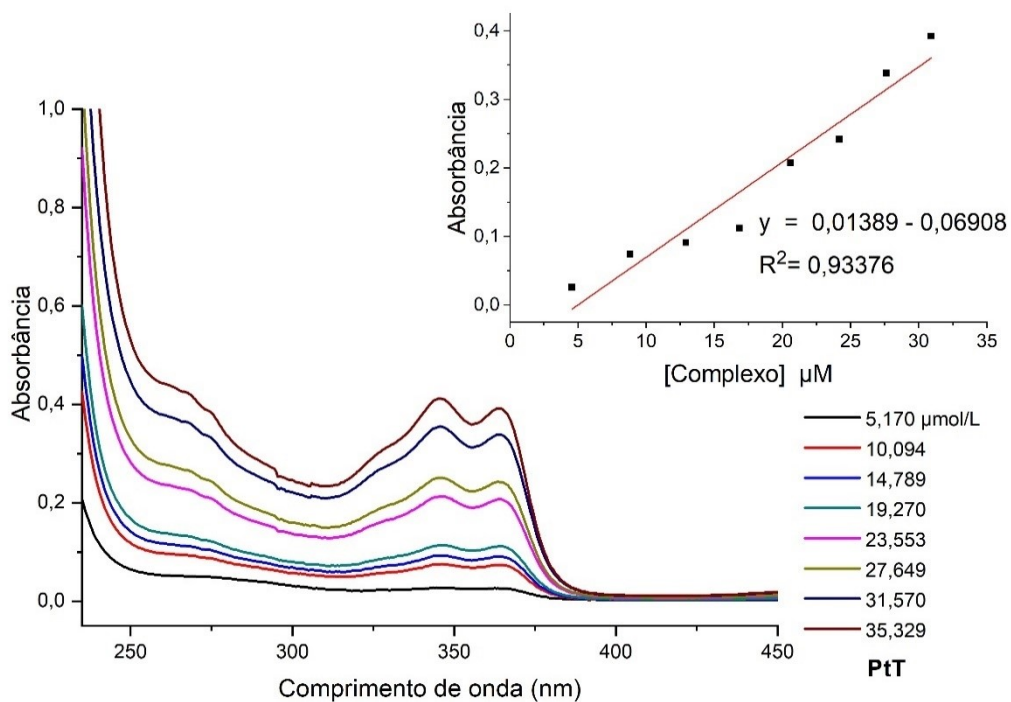


FIGURA A95 – Curva padrão proveniente do ensaio de lipofilicidade para o complexo PtT.

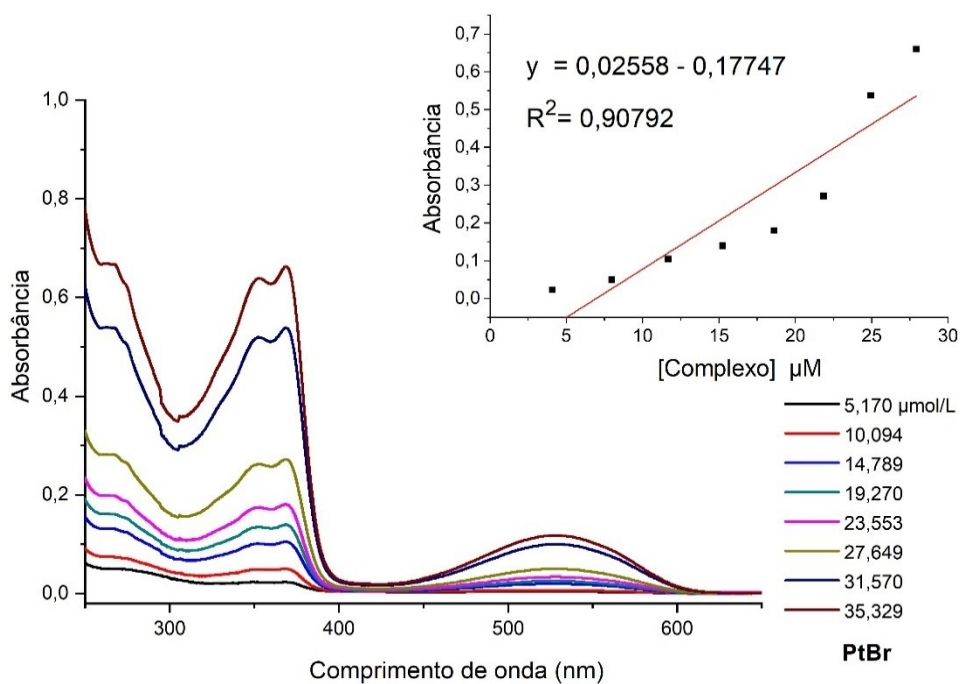


FIGURA A96 – Curva padrão proveniente do ensaio de lipofilicidade para o complexo PtBr.

## 7.9 – Espectrometria de massas

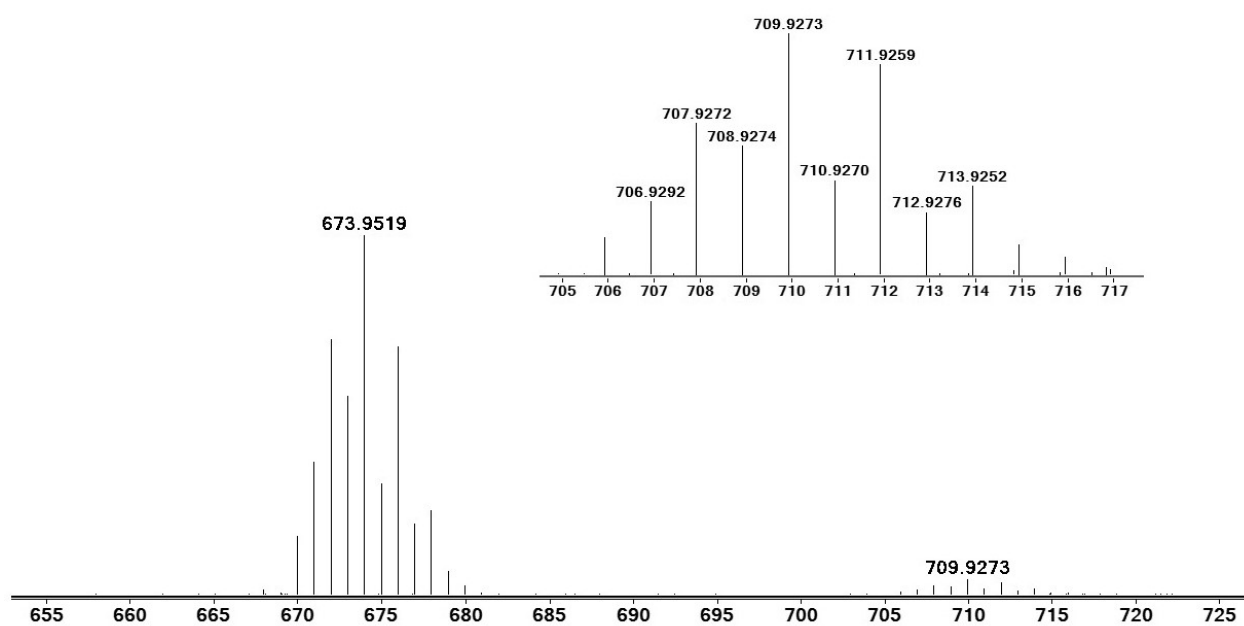


FIGURA A97 - Espectro de massas para o composto PdBr.

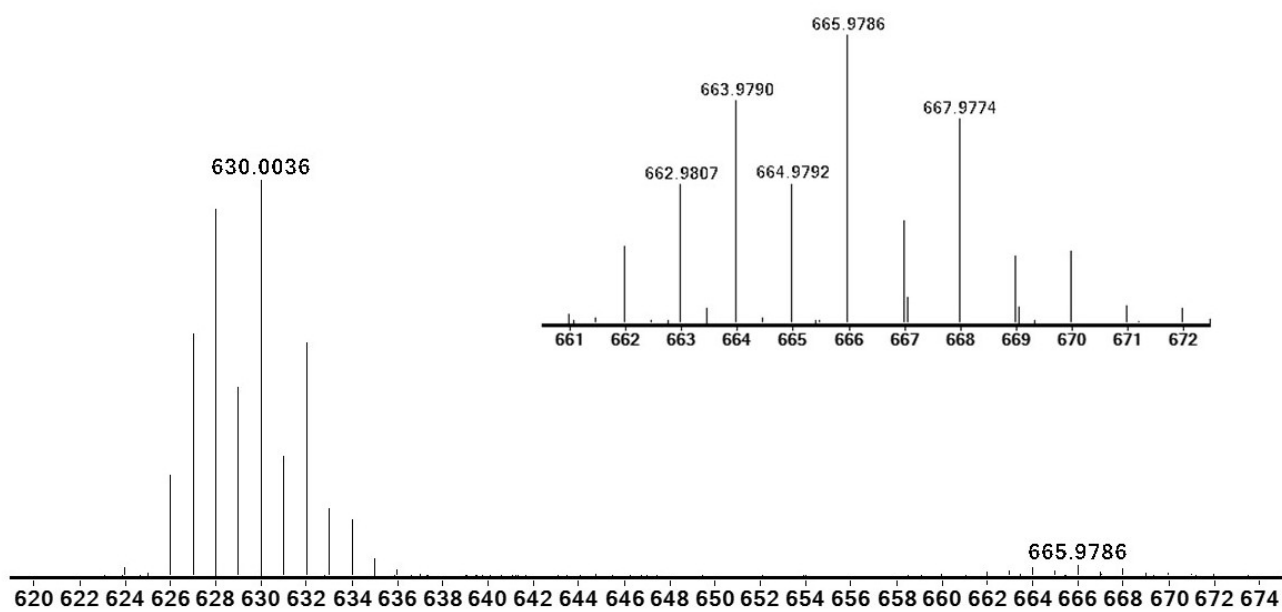


FIGURA A98 - Espectro de massas para o composto PdCl.

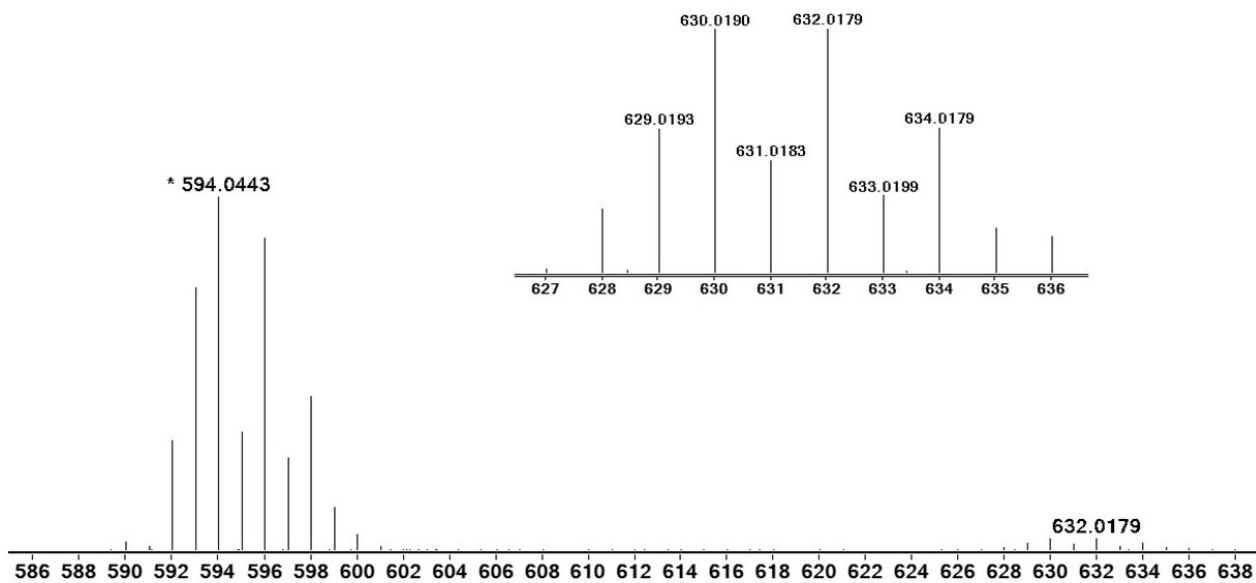


FIGURA A99 - Espectro de massas para o composto PdT.

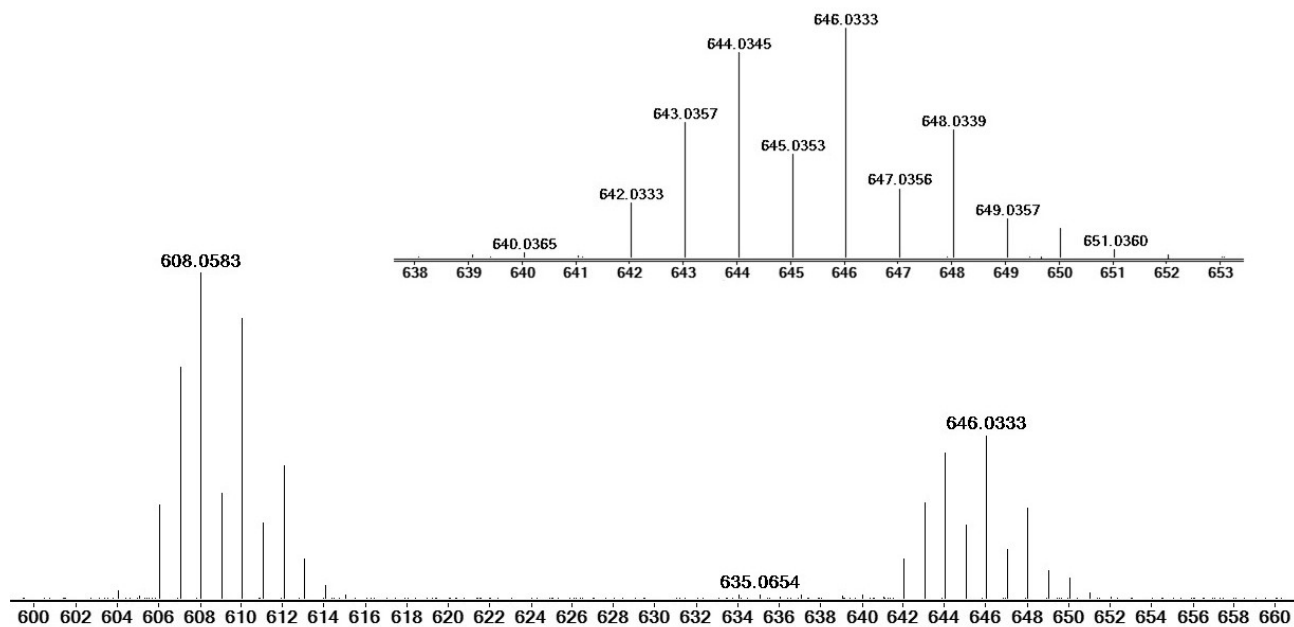


FIGURA A99 - Espectro de massas para o composto PdCH<sub>3</sub>.

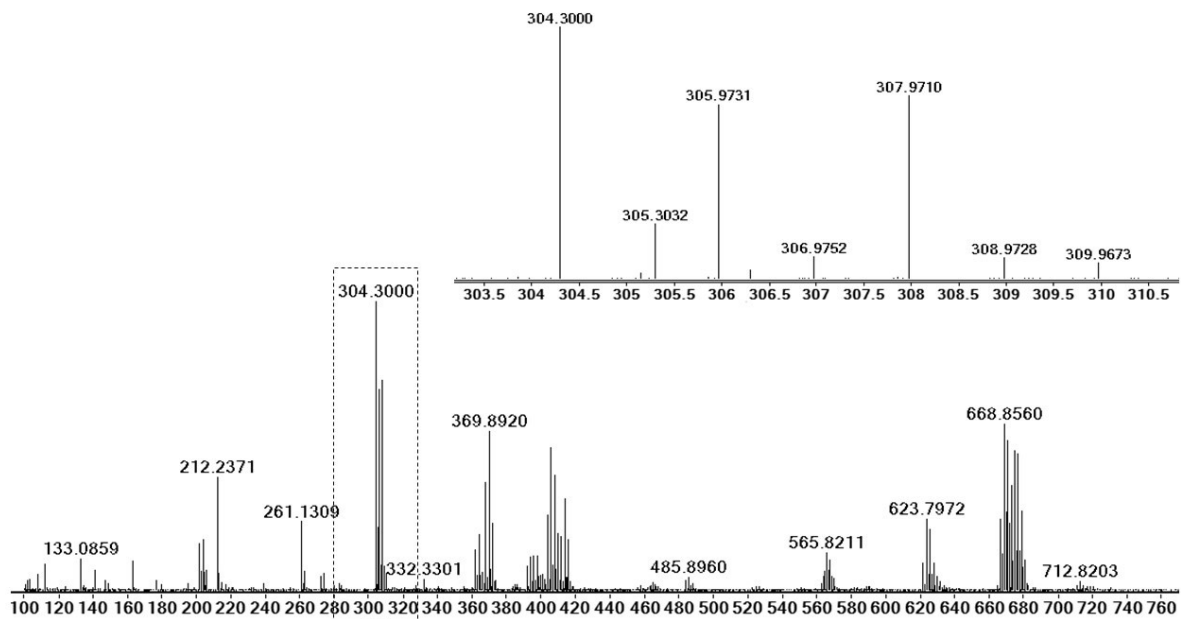


FIGURA A100 - Espectro de massas para o composto BRET.

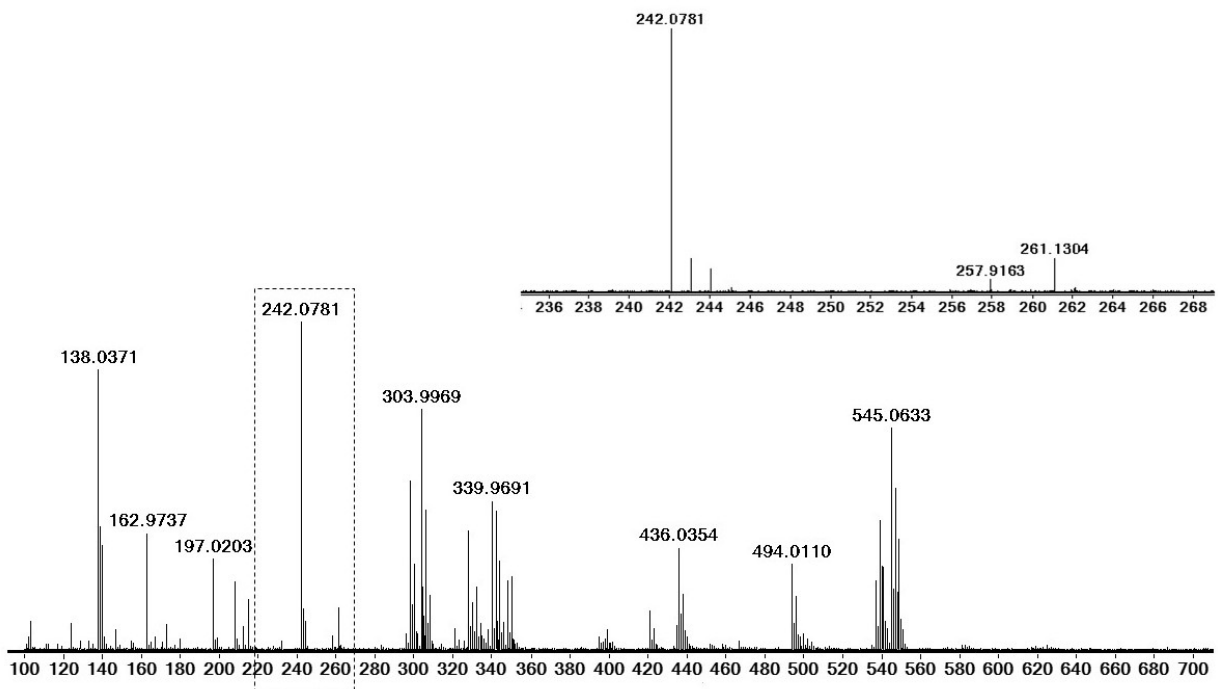


FIGURA A101 - Espectro de massas para o composto MET.

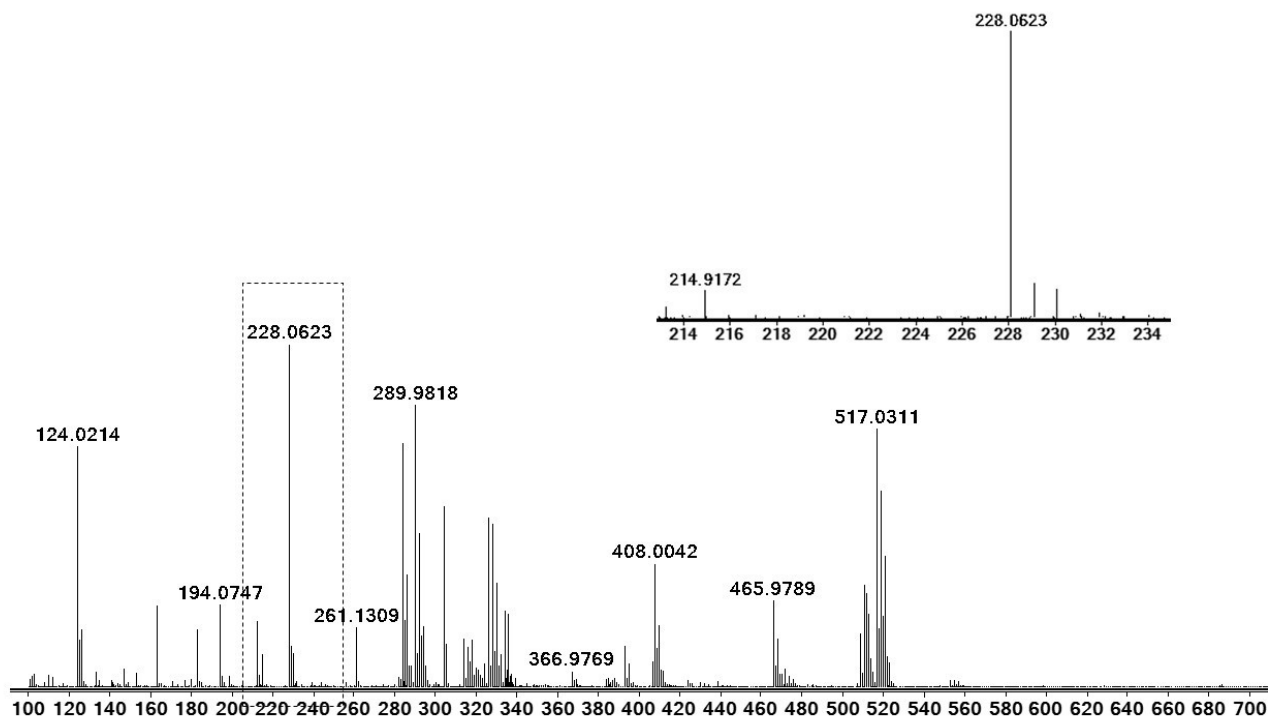


FIGURA A101 - Espectro de massas para o composto TET.

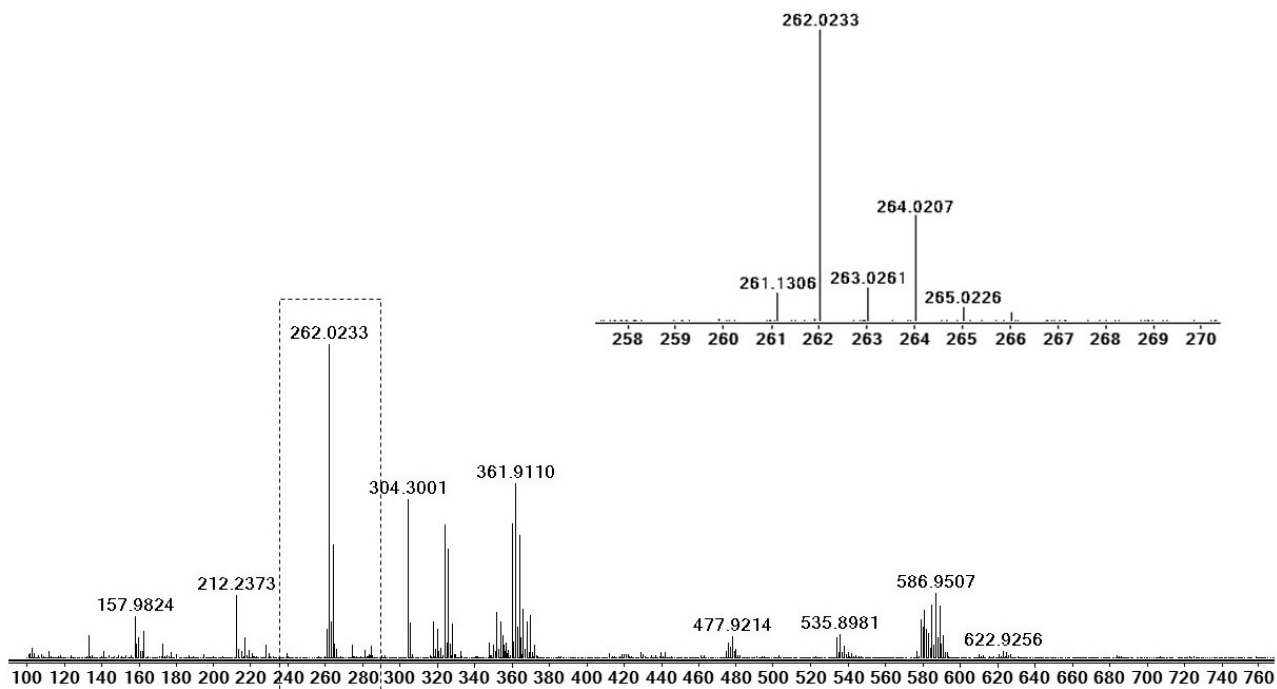


FIGURA A101 - Espectro de massas para o composto CLET.

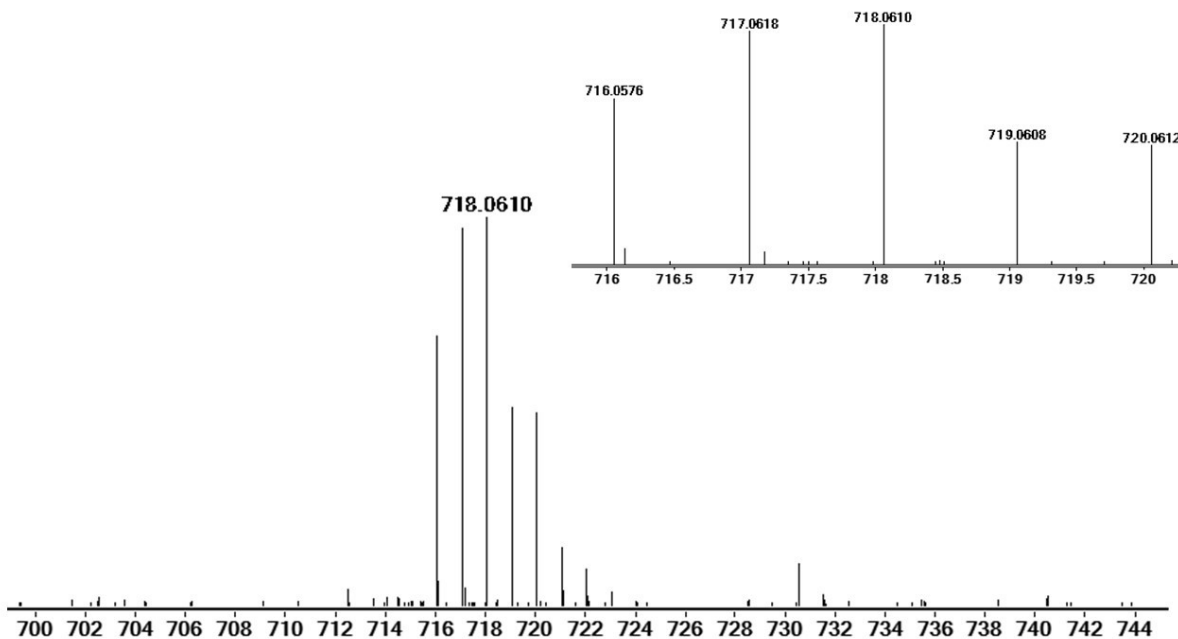


FIGURA A102 - Espectro de massas para o composto PtT.

### 7.10 – Ensaio de viscosidade

TABELA A4 – Dados resultantes do ensaio de viscosidade para o complexo PdT.

Ri*	Concentração**		Volumes de solução estoque***			
	[DNA]	[C]	Composto <sup>a</sup>	DMSO	Trisma-HCl	DNA
-	0	0	0	400	3600	0
0	80	0	0	400	3550	50
0,06	80	5	20	380	3550	50
0,12	80	10	40	360	3550	50
0,18	80	15	60	340	3550	50
0,25	80	20	80	320	3550	50
0,31	80	25	100	300	3550	50
0,37	80	30	120	280	3550	50

Ri\* = [complexo]/[DNA]